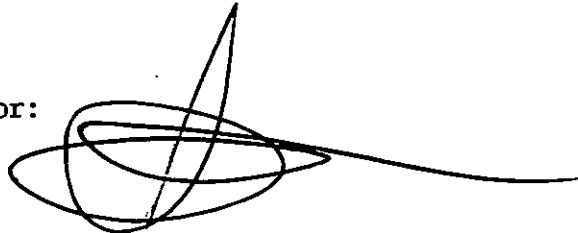


UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

INTERACCIONES DE  
Alnus glutinosa (L.) Gaertn.  
CON SU RIZOSFERA  
BAJO DISTINTAS CONDICIONES

Memoria presentada por  
Agustín Probanza Lobo  
para optar al grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas

VºBº del Director:

A handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke extending to the right.

Fdo. Dr. Francisco Javier Gutiérrez Mañero

Madrid 1994

Esta memoria ha sido realizada en los laboratorios del Colegio Universitario San Pablo CEU y de la Universidad San Pablo CEU, bajo la dirección del Pr. Dr. D. Francisco Javier Gutiérrez Mañero (mi Maestro), a quien deseo agradecer (antes que a nadie) su Amistad, interés, tiempo y paciencia (muchas veces por encima de lo necesario) sin las que este trabajo no hubiese llegado a buen término.

También quiero expresar mi gratitud a mis amigos y compañeros de laboratorio, en primer lugar y muy especialmente a Nuria Acero de Mesa por su inestimable ayuda en los aspectos que necesitaron de extrema habilidad (las mejores gráficas) o intenso trabajo (siembras, tablas, etc.) y sobre todo por su constante cariño y paciencia.

Así mismo agradezco al Dr. José Manuel Pozuelo González su ayuda en los cálculos estadísticos, así como sus contribuciones y críticas (siempre optimistas) a este trabajo.

Agradezco también a la Dra. Dolores Muñoz-Míngarro Martínez y al Dr. Francisco LLinares Pinel su inestimable ayuda (entre muchas otras cosas) en las cromatografías de lípidos e hidratos de carbono, así como por conseguir una tripa de diálisis que, finalmente, no sirvió para nada.

Vaya también mi agradecimiento para mis compañeras Begoña Blanco Urgoiti y Beatriz Ramos (CH.H.A.), por su apoyo y colaboración continua, y para José Antonio Lucas García, por su complicidad y colaboración (tanto en la elaboración tablas - o "Tábulos" - como en la rápida obtención de separatas difícilísimas de encontrar).

Gracias también a los amigos del grupo de genética, el Dr. Nuno Henriques Gil, Cecilia González, Carmina Garma y Marina Clemente por sus comentarios e ideas, por haberme ilustrado en las electroforesis de SDS-PAGE, por los programas para las benditas ANOVAs, por las fotografías, por ganarme (o ayudarme a perder) al dominó y por mil cosas más.

Deseo agradecer a la Dra. Coronación Rodríguez Borrajo, al Dr. Emilio de Castro, a Jose Alfredo Vicente Orellana y al Dr. Antonio Galán de Mera, su apoyo, ayuda (salvo en el dominó la de Emilio) e interés por el desarrollo de este trabajo.

Agradezco a las Dras. M<sup>a</sup> Soledad Martín Gómez y M<sup>a</sup> Dolores Saco Sierra, las facilidades que me brindaron para la utilización y aprendizaje del sistema de análisis de imagen en el Dpto. de Biología Vegetal II de la facultad de Farmacia (UCM).

También quiero expresar mi gratitud al Dr. José García de los Ríos por prestarnos con paciencia el Bergey's, medios de cultivo y reactivos, que tardabamos (a veces mucho) en devolver.

Por último quiero agradecer a todos aquellos que han sufrido esta Tesis de modo más o menos indirecto, sin llegar en ningún momento a las manos y ayudando, en distinta medida, a su realización: Julia, Agustín y Leticia (mis padres y hermana); Elisa; Jose Carlos; Garaña y Lucía; Gonzalo y Andrés; Patricia, Malak, Rafa, Goico, Pepe, Iván y Honorio Sixto; Molina y Laura; Carlos Gimeno, José Luis "peluqui", Jose Felix "pin-pin", Santiago, Guille y un largo etcétera.

" EL ciclo del nitrógeno no tiene una duración fija, sino aproximada, y aguanta lo que puede, unas veces más y otras menos, en esto se parece a los contribuyentes. El ciclo del nitrógeno es como una pescadilla que se muerde la cola: esto de que el nitrógeno pase de la atmósfera a los seres vivos (...) y de los seres vivos a la atmósfera (en forma de urea, albuminoides, aminoácidos y otras guarradas), es algo que debe creerse bajo juramento, ya que se mire como se mire, no tiene ni sentido común. "

**Camilo José Cela. Premio Nobel de Literatura**

**"El ciclo del nitrógeno", Nuevas escenas matritenses, 1966.**

" La nutrición de las plantas en general, depende ciertamente, de la composición de la flora edáfica de la rizosfera.(...) Si las plantas son capaces de atraer bacterias beneficiosas mediante sus excretas radicales, no ha de resultar sorprendente que puedan atraer a huéspedes no invitados, los cuáles, como los organismos beneficiosos, se adapten a secreciones específicas de la raíz."

**Lorenz Hiltner (1862-1923). Profesor de Agronomía de la Escuela Técnica de Agronomía de Munich.**

**Acuñó el término "rizosfera" en 1904.**



**A mis padres, a Leti y  
a Elisa.**

**A mis abuelos.**

## INDICE

1. INTRODUCCION.	1
1.1. El ciclo del nitrógeno.	2
1.1.1. Fijación biológica del nitrógeno.	5
1.1.1. a. Factores incidentes en la fijación de nitrógeno.	6
1.1.1.b. Microorganismos fijadores de nitrógeno.	7
1.1.2. Mineralización.	8
1.1.2.a. Factores incidentes en la mineralización.	9
1.1.2.b. Microorganismos mineralizadores.	10
1.1.3. Nitrificación.	10
1.1.3.a Factores incidentes en la nitrificación autótrofa.	11
1.1.3.b. Microorganismos nitrificantes.	12
1.1.4. Desnitrificación.	12
1.1.4.a Factores incidentes en la desnitrificación.	13
1.1.4.b. Microorganismos desnitrificantes.	14
1.2. Interacciones del sistema Planta-Suelo.	15
1.2.1. Efectos de las plantas sobre los microorganismos.	15
1.2.1.a. Efecto del lavado de la parte aérea y de la hojarasca.	16
1.2.1.b. Efecto de la rizosfera: exudados radicales.	18
1.2.2. Efectos de los microorganismos sobre las plantas.	26
1.2.2.a. Organismos rizosféricos.	26
1.2.2.b. Sustancias microbianas que afectan a las plantas.	29
1.3. <u>Alnus glutinosa</u> .	35
1.4. Plan de trabajo: Objetivos.	36
<b>2. MATERIALES Y METODOS EMPLEADOS EN LAS EXPERIENCIAS REALIZADAS EN EL SENTIDO PLANTA-SUELO.</b>	<b>38</b>
2.1. Caracterización de las zonas de muestreo.	39
2.2. Zonas de recogida de nódulos y raíces.	41
2.3. Recogida y preparación de muestras de suelo.	41
2.4. Recogida y preparación de nódulos y raíces.	42
2.5. Obtención de exudados.	42
2.5.1. Obtención de exudados nodulares y radicales.	42
2.5.2. Obtención de exudados de plantas noduladas y sin nodular.	43

2.6. Caracterización de suelos y exudados.	45
2.6.1. Análisis fisicoquímico de suelos.	45
2.6.1.a. Capacidad de retención máxima (CRM).	45
2.6.1.b. Textura de los suelos.	46
2.6.1.c. Medida del pH.	46
2.6.1.d. Determinación del nitrógeno total.	46
2.6.1.e. Determinación del nitrógeno amonio.	47
2.6.1.f. Determinación del nitrógeno nitrato.	47
2.6.1.g. Determinación del carbono orgánico.	47
2.6.2. Análisis fisicoquímico de los exudados.	48
2.6.3. Caracterización bioquímica de los exudados.	48
2.6.3.1. Proteínas.	49
2.6.3.2. Hidratos de carbono.	49
2.6.3.3. Lípidos.	50
2.7. Análisis de la actividad de los grupos funcionales del ciclo del nitrógeno en presencia de exudados.	51
2.7.1. Determinación de la actividad reductora de acetileno (ARA) potencial en presencia de exudados.	51
2.7.2. Determinación del potencial amonificante en presencia de exudados.	52
2.7.3. Determinación del potencial nitrificante en presencia de exudados.	53
2.7.4. Determinación del potencial desnitrificante en presencia de exudados.	54
2.7.5. Determinación de la producción de dióxido de carbono en presencia de exudados.	55
2.8. Tratamiento de la información.	55
<b>3. MATERIALES Y METODOS EMPLEADOS EN LAS EXPERIENCIAS REALIZADAS EN EL SENTIDO SUELO-PLANTA.</b>	57
3.1. Determinación de las bacterias rizosféricas de <u>A. glutinosa</u> .	58
3.1.1. Recogida y preparación de las muestras de suelo.	58
3.1.2. Preparación de las suspensiones-diluciones de suelo y selección de las bacterias identificadas.	58
3.1.3. Identificación de las bacterias pertenecientes a los géneros mayoritarios ( <u>Bacillus</u> y <u>Pseudomonas</u> ).	60
3.1.4. Análisis de los grupos funcionales del ciclo del nitrógeno.	62
a. Diazotrofos aerobios.	62
b. Diazotrofos anaerobios.	62
c. Amonificantes.	62
d. Nitrificantes nitrosos.	63
e. Nitrificantes nítricos.	63
f. Desnitrificantes.	63

3.2. Efectos de las rizobacterias mayoritarias sobre la germinación y crecimiento de <u>Alnus glutinosa</u> : Descripción general del procedimiento.	64
3.2.1. Selección de las rizobacterias ensayadas.	64
3.2.2. Preparación del medio de cultivo bacteriano.	66
3.2.3. Semillas y plantas de <u>Alnus glutinosa</u> empleadas en los ensayos.	66
3.2.4. Ensayos de germinación.	68
3.2.5. Ensayos de crecimiento con plantas sin nodular y noduladas.	69
a. Ensayos de crecimiento con plantas sin nodular.	69
b. Ensayos de crecimiento con plantas noduladas.	71
3.3. Tratamiento de la información.	74
3.3.1. Variación estacional de las rizobacterias de <u>A. glutinosa</u> .	74
3.3.2. Efecto de las bacterias mayoritarias sobre la germinación de <u>Alnus glutinosa</u> .	74
3.3.3. Efecto de las bacterias mayoritarias sobre el crecimiento de <u>Alnus glutinosa</u> .	75
<b>4. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA INTERACCION EN EL SENTIDO PLANTA-SUELO.</b>	76
4.1. Caracterización de los suelos.	77
4.2. Caracterización de los exudados nodulares y radicales.	80
4.2.1. Caracterización fisicoquímica.	80
4.2.2. Caracterización bioquímica.	82
4.3. Caracterización de los exudados en plantas noduladas y sin nodular.	84
4.3.1. Caracterización fisicoquímica.	84
4.3.2. Caracterización bioquímica.	86
4.4. Efecto de los exudados sobre los grupos funcionales del ciclo del nitrógeno.	88
4.4.1. Fijación de nitrógeno potencial (ARA).	88
4.4.1.1. Efecto de los exudados nodulares y radicales.	88
4.4.1.2. Efecto de los exudados de plantas noduladas y sin nodular.	92
4.4.2. Mineralización potencial.	96

4.4.2.1. Efecto de los exudados nodulares y radicales.	96
4.4.2.2. Efecto de los exudados de plantas noduladas y sin nodular.	100
4.4.3. Nitrificación potencial.	102
4.4.3.1. Efecto de los exudados nodulares y radicales.	102
4.4.3.2. Efecto de los exudados de plantas noduladas y sin nodular.	106
4.4.4. Desnitrificación potencial total.	110
4.4.4.1. Efecto de los exudados nodulares y radicales.	110
4.4.4.2. Efecto de los exudados de plantas noduladas y sin nodular.	114
4.4.5. Producción de CO <sub>2</sub> .	118
4.4.5.1. Efecto de los exudados nodulares y radicales.	118
4.4.5.2. Efecto de los exudados de plantas noduladas y sin nodular.	122
<b>5. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL SENTIDO PLANTA-SUELO.</b>	126
<b>6. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA INTERACCION EN EL SENTIDO SUELO-PLANTA.</b>	142
6.1. Análisis fisicoquímicos de los suelos rizosféricos.	143
6.2 Géneros bacterianos encontrados y frecuencia de los mismos.	145
6.2.1. Caracterización subgenérica de <u>Bacillus</u> y <u>Pseudomonas</u> .	149
6.2.2. Ciclo del nitrógeno.	154
6.2.3. Análisis de componentes principales de la variación estacional de géneros.	161
6.2.4. Análisis de la varianza.	163
6.3. Efecto de las rizobacterias mayoritarias sobre la la germinación de <u>Alnus glutinosa</u> .	167
6.3.1. Electroforesis de proteínas de reserva en las semillas empleadas.	167
6.3.2. Resultados de los ensayos de germinación.	169
6.3.3. ANOVAs de pendientes de las rectas de regresión obtenidas a partir de los datos de germinación.	175
6.3.4. ANOVAs de pendientes de los grupos de cepas activadoras e inhibidoras.	176

6.4. Efecto de las rizobacterias mayoritarias sobre el crecimiento de <u>Alnus glutinosa</u> .	180
6.4.1. ACP realizado con los datos de crecimiento vegetal bajo el efecto de las diferentes cepas ensayadas.	183
6.4.2. ACP de los resultados en plantas sin nodular (PSN).	186
6.4.3. ACP de los resultados en plantas noduladas (PN).	190
6.4.4. ANOVAs de los parámetros considerados en los ensayos de plantas sin nodular.	194
6.4.4.1. Superficie de la parte aérea de las plantas.	195
6.4.4.2. Longitud de la parte aérea de las plantas.	195
6.4.4.3. Número de hojas.	196
6.4.4.4. Contenido en nitrógeno total.	197
6.4.4.5. Superficie del aparato radical.	198
6.4.4.6. Longitud del aparato radical.	199
6.4.5. ANOVAs de los parámetros considerados en los ensayos de plantas noduladas.	200
6.4.5.1. Superficie de la parte aérea de las plantas.	200
6.4.5.2. Longitud de la parte aérea de las plantas.	201
6.4.5.3. Número de hojas.	202
6.4.5.4. Contenido en nitrógeno total.	203
6.4.5.5. Superficie del aparato radical.	204
6.4.5.6. Longitud del aparato radical.	205
6.4.5.7. Actividad reductora del acetileno (ARA).	206
6.4.5.8. Producción de CO <sub>2</sub> por los nódulos.	207
7. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL SENTIDO SUELO-PLANTA.	209
7.1. Composición bacteriana de la rizosfera de <u>Alnus glutinosa</u> y su variación estacional: grupos taxonómicos y fisiológicos.	210
7.2. Efectos de las cepas de <u>Bacillus</u> y <u>Pseudomonas</u> sobre la germinación.	215
7.3. Efectos de las cepas de <u>Bacillus</u> y <u>Pseudomonas</u> sobre el crecimiento de plantas noduladas y sin nodular.	219
8. CONCLUSIONES.	229
9. BIBLIOGRAFIA.	233
10. APENDICES.	257
Apéndice A.	258
Apéndice B.	264
Apéndice C.	279

## 1. INTRODUCCION

En el suelo, los macronutrientes, son puestos a disposición de los productores primarios gracias a las transformaciones llevadas a cabo por los microorganismos edáficos. De esta manera se permite el tránsito a los consumidores primarios y al resto de la cadena trófica.

También la microflora edáfica y la vegetación, entre otros factores, inciden sobre la composición granulométrica y mineralógica, favoreciendo el desarrollo de una estructura adecuada que sirve de soporte a sus actividades. Dicho efecto se verifica a través de los sistemas radicales (Lynch, 1981), debido a la producción de materiales orgánicos por parte de las raíces y microorganismos edáficos y por la formación de agregados de bacterias y hongos. Todo ello contribuye al desarrollo de una estructura edáfica que permite el intercambio de nutrientes, así como el almacenamiento de agua y aire para las plantas. Esta región de intensa actividad microbiana, en la que interaccionan plantas y microorganismos de una forma íntima se conoce con el nombre de rizosfera y se define como el volumen de suelo influenciado por la raíz. Este término fue acuñado por Hiltner en 1904 si bien ha sido redefinido en distintas ocasiones.

En el presente trabajo se abordan distintos aspectos del efecto rizosfera, referidos fundamentalmente, a la dinámica del ciclo del nitrógeno y a la influencia de las poblaciones bacterianas sobre el crecimiento del vegetal, razón por la cual hacemos referencia al ciclo del nitrógeno en primer lugar.

### 1.1. El ciclo del nitrógeno

A partir de los trabajos de Hutchinson (1950), el estudio de las comunidades microbianas edáficas, junto a los componentes bióticos y abióticos con los que se desarrollan, han sido objeto de profundos estudios debido a su decisiva incidencia en la conservación del medio. En este sentido al ciclo del nitrógeno se le ha prestado especial atención.

El nitrógeno es un elemento muy abundante en el planeta en las rocas ígneas ( $14 \times 10^9$  Tg), sedimentos y rocas sedimentarias ( $4 \times 10^9$  Tg), como nitrógeno atmosférico ( $3.9 \times 10^9$  Tg), nitrógeno de biomasa oceánica ( $5 \times 10^2$  Tg) y nitrógeno de biomasa terrestre ( $1.5 \times 10^4$ ). A pesar de su abundancia,



la biodisponibilidad es baja. La causa de ello está en que el nitrógeno molecular es inaccesible para la mayor parte de los seres vivos por lo que no se puede utilizar como fuente de nitrógeno. Sólo algunos microorganismos son capaces de emplearla como tal.

Las etapas del ciclo del nitrógeno consisten en una serie de reducciones y oxidaciones sucesivas, que conducen a la transformación del nitrógeno en formas accesibles al metabolismo de animales, plantas y microorganismos, haciendo circular este elemento de manera cíclica a través del suelo y de la atmósfera (Figura 1.1). Estas etapas son:

- \* Fijación del nitrógeno: es la reducción del nitrógeno molecular a amoníaco, que puede ser utilizado de esta forma o incorporado a los compuestos orgánicos.

- \* Mineralización: es la transformación del nitrógeno orgánico en nitrógeno mineral. Estrictamente, la mineralización es el mismo proceso que la amonificación (Blackburn, 1983 ; Turner y Franz, 1985). Alef y Kleiner (1986) lo definen como la liberación de amonio a partir de compuestos orgánicos nitrogenados que desaparecen como fuente de nitrógeno o de carbono durante el proceso.

- \* Nitrificación: oxidación del amonio hasta nitrito o nitrato.

- \* Desnitrificación: reducción del nitrato hasta óxidos de nitrógeno o dinitrógeno.

Sprent (1990) habla de dos grupos de microorganismos implicados en las etapas antes citadas. Por una parte los que actúan sobre compuestos de nitrógeno e incorporan a sus células el producto de la reacción (fijadores y mineralizadoras) y los que usan la reacción con fines energéticos (nitrificantes y desnitrificantes).

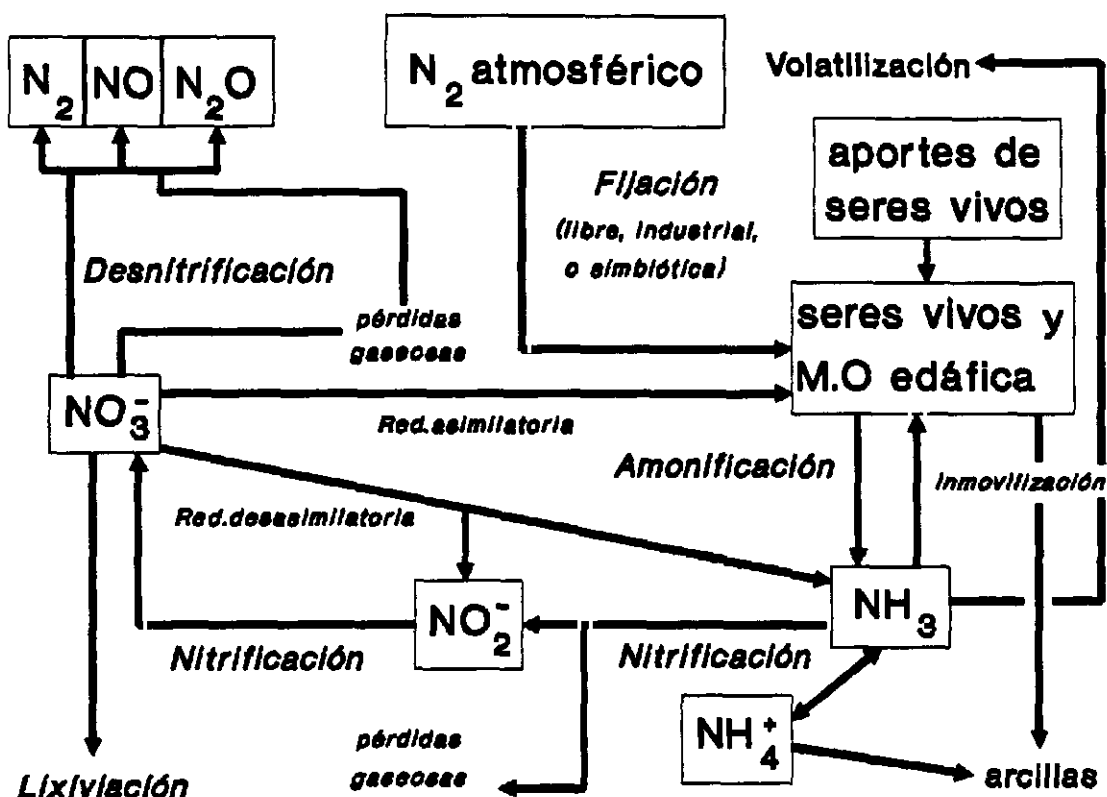


Figura 1.1: Representación esquemática del ciclo del nitrógeno.

El ciclo del nitrógeno ha sido objeto de especial atención por diversas razones, entre las que podemos destacar:

- El incremento de nitrificación y desnitrificación puede ir acompañado, directa o indirectamente de un aumento de la producción de óxido nitroso, que afecta a la capa de ozono (Ryden, 1981).

- Algunas formas de nitrógeno combinado afectan a la tasa de producción primaria y a la descomposición de la materia orgánica, así como a otros procesos que se dan en los ecosistemas: el uso eficiente del agua por las plantas y la nutrición de los organismos superiores.

- El aumento de la producción y pérdidas de nitratos puede incrementar las pérdidas de cationes solubles. Likens *et al.*, (1969) y Jhonson y Cole (1980) inciden en esto y lo explican en base a que los aniones móviles regulan el lavado de los cationes.

- Las pérdidas de nitrógeno, mayoritariamente en forma de nitrato, son en muchas ocasiones mayores que las pérdidas de cualquier otro nutriente (Vitousek *et al.* 1982)

- La disponibilidad de nitrógeno para la nutrición vegetal es uno de los factores determinantes de la riqueza en lignina, lo que condiciona los aportes de compuestos fenólicos y de materia orgánica fácilmente degradable, además los compuestos fenólicos acidifican el sustrato, dificultando la movilización de nutrientes (Gosz, 1981).

- Efectos de la acumulación de nitritos y nitratos en las cadenas tróficas sobre la salud humana: metahemoglobinemia en niños, cáncer y enfermedades respiratorias (Keeney, 1980).

#### 1.1.1. Fijación biológica del nitrógeno

La fijación de nitrógeno es la etapa reguladora del ciclo, junto con la fotosíntesis este proceso es clave en la producción de los ecosistemas (Worthington, 1975). La fijación biológica del nitrógeno es exclusiva de ciertos procariotas que poseen el aparato enzimático necesario para reducir el nitrógeno molecular, de estado de oxidación 0, hasta amonio, con estado de oxidación -3. Este amonio es incorporado a compuestos orgánicos formando glutamina u otros compuestos nitrogenados (Wolk et al, 1976)

Este proceso requiere un gasto energético elevado. En este sentido Blackburn (1983) apunta a los microorganismos fijadores libres fotosintéticos como los reductores más eficaces.

Se debe de indicar pues que debido al elevado requerimiento energético del proceso y como quiera que la energía solar incide escasamente sobre la productividad del suelo, la mayoría de los fijadores libres son microorganismos heterótrofos (Child, 1981).

Por las razones expuestas se establecen procesos de simbiosis entre fabáceas y bacterias y entre otras angiospermas no leguminosas y actinomicetos, relaciones que resultan de gran importancia en agricultura y silvicultura respectivamente. Además la asociación de vegetales nodulados con otros permite una mejor nutrición nitrogenada de estos cultivos. Herridge (1988) demuestra cómo se optimiza la producción de los cereales alternando en años sucesivos en una misma parcela el cultivo de Lupinus angustifolia L.. Miller et al. (1993) demuestra así mismo que en plantaciones mixtas de Pinus sp. y Myrica sp. se obtiene mayor volumen de madera y mayor contenido en nitrógeno que en monocultivos de la resinosa.

La fijación de nitrógeno se cifra entre 289 y 384 Tg N/año por distintas vías (biológica, industrial - fertilizantes - y espontánea - combustión, descargas eléctricas-) que compensan las pérdidas por volatilización de amonio (13-23 Tg N/año), lixiviación (30 Tg N/año), desnitrificación (11-44 Tg N/año), cosechas (30 Tg N/año), y erosión (2-20 Tg N/año); (Roswal y Pauistian, 1984).

#### 1.1.1.a. Factores incidentes en la fijación del nitrógeno

El oxígeno resulta ser uno de los factores que más inciden en la fijación biológica del nitrógeno. El enzima responsable de la reducción, la nitrogenasa, sufre una inactivación irreversible cuando se expone a la acción del oxígeno (Wong y Burris, 1972). Concentraciones de oxígeno elevadas (en condiciones de estrés hídrico) disminuyen el peso de nódulos y la actividad fijadora de la asociación rizosférica en cereales (Walker y Miller, 1986).

Los microorganismos libres han desarrollado sistemas que protegen la actividad nitrogenásica en ambientes aerobios (Drozd y Postage, 1980). En cuanto a simbiosis en no leguminosas, Silvester et al (1988), describen cambios estructurales en los nódulos de Alnus incana encaminados a minimizar la entrada de aire al interior. También se han descrito crecimientos del grosor de los nódulos radiculares de Myrica gale inversamente proporcionales a la presión de oxígeno a que se les somete (Schwintzer et al., 1982).

El pH afecta a los microorganismos diazotrofos libres. Velasco y Lozano (1979) estiman el pH óptimo para Clostridium ligeramente por debajo de 7, pH análogo al que Granhall (1981) apunta para Azotobacter. Dobrénier y Campelo (1971) y Becking (1961) también señalan como pH óptimo 7 ó ligeramente menor para Derexia y Beijerinckia respectivamente.

El exceso en la concentración de nitrato puede inhibir la fijación simbiótica, (Nelson y Edic, 1988). Gibson y Jordan (1983) estimaron que incluso concentraciones de nitrato por debajo de 1 mM puede impedir la formación de nódulos en fabáceas.

La edad de la planta resulta ser inversamente proporcional a la tasa de fijación como señalan Doyle et al., (1988). Kimow y Debron (1989) afirman además que lo es a la precocidad y densidad de la nodulación.

El cofactor de la nitrogenasa, el molibdeno, actúa como condicionante de la actividad fijadora. Grant y Binkley (1987) encuentran que al adicionar molibdeno a un medio con fijadoras aumenta la actividad. No obstante, Bishop *et al.* (1986) señala que mutantes de Azotobacter vinelandii carentes de algunos genes relacionados con la nitrogenasa pueden fijar nitrógeno en ausencia de molibdeno en el medio de cultivo, al parecer induciendo la ausencia del metal un nuevo sistema alternativo.

La materia orgánica y el fósforo incrementan la tasa de fijación, como demuestran Grant y Binkley (1987) al añadirlos a suelos de bosque, observando un incremento significativo de la fijación libre. Kay y Virginia (1989) encuentran en ecosistemas de tundra que es limitante la cantidad de carbono orgánico para estos mismos microorganismos.

La cantidad de calcio también influye en la actividad nitrogenásica. Algunas cepas de Synechococcus cuando incrementan su actividad con concentraciones de 2mM (Chen *et al.*, 1988).

La fijación de nitrógeno ocurre en un intervalo de temperatura muy amplio, desde -5°C como en el líquen Solorina crocea, hasta 60°C como el alga Mastigocladus que habita en fuentes termales (Stewart, 1974). No obstante, la mayoría de las fijadoras libres son mesófilas (Granhall, 1981).

#### 1.1.1.b. Microorganismos fijadores

El grupo de los organismos fijadores de nitrógeno atmosférico está formado por numerosos procariotas. Las cianofíceas, entre las que destacan diversas especies del género Anabaena (Rinaudo *et al.*, 1971), fijando nitrógeno a través de los heterocistos, si bien hay especies fijadoras que no forman estas estructuras. Microorganismos del género Nostoc también actúan como fijadoras libres, estimándose la cantidad de nitrógeno fijado en torno a 30 Kg N ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> (Sevillano y Rodríguez-Barrueco, 1987). Es importante reseñar que las cianofitas pueden sufrir enquistamientos y sobrevivir durante largos períodos de tiempo a la desecación (Skujins, 1981).

Se han encontrado bacterias aerobias, fijadoras de nitrógeno en los géneros Azotobacter, Beijerinckia, Derexia y Azotomonas, que exhiben estructuras contra la desecación, exosporas y cistos (Lin y Sadoff 1969). Entre las bacterias anaerobias estrictas, las más importantes son del género Clostridium (Rosemblun y Wilson, 1949) y facultativas del género Bacillus (Line y Loutit, 1971). Estas son capaces de resistir calor, desecación y tóxicos químicos, mediante la formación de endosporas.

Además de las mencionadas, se ha comprobado que especies de otros géneros como Chromarium, Rhodopseudomonas, Rhodospirillum, Rhodomicrobium, Chlorobium, Chloropseudomonas, Desulfovibrio, Desulfotomaculum, Klebsiella, Azospirillum, Pseudomonas, Vibrio, Thiobacillus, y Methanobacillus son capaces de fijar el nitrógeno atmosférico (Blackburn, 1983).

Respecto a las bacterias fijadoras capaces de establecer simbiosis con traqueófitos las más estudiadas corresponden a Rhizobium con las fabáceas (cuya actividad establecen Hardy y Holsten (1972) en 90 millones de Tg de nitrógeno/año) y de Frankia con angiospermas no leguminosas (Becking, 1974). Algunas cianofitas también establecen simbiosis, si bien lo hacen con pteridófitos del género Azolla, pudiendo fijar entre 10 y 200 Kg de Nitrógeno por hectárea y año (Sevillano y Rodríguez-Barrueco, 1987).

### 1.1.2. Mineralización

Consiste en un conjunto de reacciones en virtud de las cuales se transforma el nitrógeno orgánico a la forma amoniacal. Parte del amonio que es liberado en la acción de los microorganismos heterótrofos, es utilizado para su propio desarrollo por lo que queda inmovilizado. No obstante esta inmovilización es relativa, ya que el amonio asimilado no escapa a la dinámica del ciclo, y a medio plazo este nitrógeno se volverá a incorporar al suelo siendo disponible para las plantas. Esta es la razón de la demora en el rendimiento de fertilizantes (Broadbent y Nakashima, 1967).

La inmovilización ha sido objeto de numerosos estudios. Hsieh (1988) observa que en zonas pantanosas el nitrógeno añadido en forma de nitrato amónico puede quedar inmovilizado por espacios de tiempo superiores a 8 meses.

Hadas et al (1989) establece una tasa algo menor (13-26%) en suelos adaptados para el cultivo en Israel.

#### 1.1.2.a. Factores incidentes en la mineralización

La temperatura es uno de los factores que inciden en la mineralización. Standford et al (1973) comprueban que el proceso se detiene cuando la temperatura desciende de 0°C o es superior a 45°C, resultados que en parte coinciden con los aportados por Choudhury y Cornfield (1978) que amplían el límite hasta 50-60°C.

La humedad afecta también a la mineralización. Miller y Jhonson (1964) establecen el óptimo entre -0.5 y 1.5 bar. Moorhead et al (1989) detectan en sus estudios de incubación de tierras que las tasas de mineralización son superiores cuanto mayor grado de humedad tenga la materia orgánica que se adicione al medio. En suelos secados al aire el 80-90% de la mineralización ocurre gracias al agua retenida por el complejo poroso del suelo (Standford y Epstein, 1974).

Otro factor muy a tener en cuenta es el pH, que como señala Sahrawat (1982) en sus estudios de suelos tropicales, observa un ascenso de la tasa de mineralización según desciende el pH, registrando el valor máximo entre 5.5 y 6. Experiencias en lugares de clima mediterráneo muestran resultados semejantes, como los obtenidos por Lozano y Velasco (1972) en bosques repoblados con Pinus radiata.

Las asociaciones organominerales del suelo condicionan la mineralización. Los niveles máximos de actividad se hallan en las fracciones de diámetro inferior a 50 µm (Delfhin, 1986) por lo cual se puede pensar que la mayor parte del nitrógeno orgánico que accede al suelo se transforma en nitrógeno mineral varios años después.

La vegetación dominante sobre un suelo también forma parte del conjunto de variables que condicionan la mineralización y Gökçeoglu (1988) atribuye a ésta una importancia capital en sus estudios de dehesas y pinares mediterráneos, aunque de este factor se hará extensa mención más adelante.

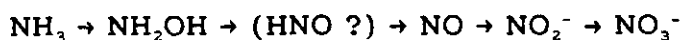
#### 1.1.2.b. Microorganismos mineralizadores

El grupo funcional de los mineralizadores es amplio y abarca a hongos y bacterias. Entre los primeros destacan los géneros Mucor y Rhizopus y ascomycotinas como Aspergillus y Penicilium (Garret, 1963 y Alexander, 1980). Los hongos liberan menos amonio que las bacterias, dada su mayor necesidad de nitrógeno para la síntesis celular. Los hongos abundan en medios de pH más bien ácido (Garret, 1963). Las bacterias están representadas por diversas especies entre las que destacan las pertenecientes a los géneros Pseudomonas, Clostridium, Serratia, Bacillus, Escherichia y Micrococcus. A diferencia de los hongos, Garret (1963) señala una mayor abundancia de bacterias en medios básicos o neutros.

Alexander (1980) apunta que los microorganismos mineralizantes son capaces de formar estructuras de resistencia, viables tras espacios de tiempo extensos, en condiciones de desecación, aerobiosis (para anaerobias), anaerobiosis (para aerobias) o ausencia de sustratos mineralizables.

#### 1.1.3. Nitrificación

Consiste, como ya se ha señalado anteriormente, en la oxidación del amonio a nitrito y nitrato. Alexander (1980) esquematiza el proceso de la siguiente manera:



Montagnini y Buschbacher (1989), señalan que es la disponibilidad de amonio la reguladora de la nitrificación en suelos no perturbados o de agricultura de subsistencia (corte y quema). Aunque la nitrificación es más lenta que la mineralización (Stanford *et al.*, 1975) en algunos casos el factor limitante de la nitrificación es la velocidad de mineralización, como consecuencia de la estabilidad de la materia orgánica.

Por otra parte el amonio producido en la mineralización puede volatilizarse. Esta pérdida, que De Datta (1987) estima entre un 5 y un 47% del nitrógeno añadido anualmente como fertilizante, implica una disminución del sustrato inicial de la nitrificación.



El nitrato puede ser también reducido asimilatoriamente (se han encontrado procariotas capaces de dicha reducción) sin que éste sea expulsado al medio (Blackburn, 1983). Esta ruta es reprimida por el amonio y no está acoplada a la producción de ATP, por lo que se verifica en aerobiosis y en anaerobiosis.

Yordy y Ruoff (1981), apuntan que existe una vía desasimilatoria que produce amonio y que sí está acoplada a la formación de ATP. Esto supone para los microorganismos que la poseen, una fuente extra de energía y para los ecosistemas una vía de liberación de nitrito y de exceso de poder reductor.

La nitrificación puede ser realizada también por microorganismos heterótrofos. Los estudios llevados a cabo con cultivos de microorganismos heterótrofos (Doxtader y Alexander, 1966, Focht y Verstraete, 1977, Schmidt, 1973 y Tate, 1985) indican que éstos no hacen uso de la energía liberada en la oxidación para su crecimiento y, como apunta Alexander (1980), los productos oxidados no aparecen hasta que ha cesado la fase exponencial de crecimiento.

#### 1.1.3.a. Factores incidentes en la nitrificación autótrofa

El agua condiciona la nitrificación, estando las condiciones óptimas de humedad establecidas en una tensión de 0.1 bar. El exceso de humedad puede llegar a bloquearla al impedir la difusión de oxígeno necesario para el proceso (Sabey, 1967).

Otro factor que afecta es la temperatura, ya que cuando ésta es inferior a 5°C se bloquea la nitrificación y el óptimo está entre 20 y 25°C. Sin embargo, Frederick (1957), comprobó que los microorganismos nitrificantes disponen de una gran capacidad de adaptación que les permite desarrollar sus actividades en un rango amplio de temperaturas.

El pH óptimo en el que se da la nitrificación se ha situado en torno a 7 y 8.5, pues por debajo de 7 la nitrificación disminuye y el descenso es muy acusado cuando el pH es menor de 5 (Katial et al., 1988).

La granulometría influye en la nitrificación no solo por el efecto de la difusión del oxígeno sino también porque las cargas negativas de las arcillas son capaces de retener el amonio extraíble, encontrándose una relación inversa entre nitrificación y contenido en arcillas del suelo ( Seiferet ,1969 y Cerna, 1967). Según Simón-Silvestre y Calvet, (1987) esta adsorción del amonio a las arcillas imposibilita el proceso de oxidación, por lo que el incremento en arcillas modifica considerablemente las características cinéticas de la nitrificación.

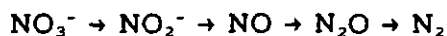
#### 1.1.3.b. Microorganismos nitrificantes

Focht y Verstraete (1977) señalan numerosas bacterias heterótrofas y hongos que pueden oxidar formas reducidas de nitrógeno y producir nitrito y nitrato. Sin embargo las bacterias nitrificantes que dominan en la naturaleza son autótrofas (Kelly, 1978). Las bacterias nitrificantes tanto nitrosas como nítricas, pertenecen a la familia Nitrobacteriaceae: Nitrosomonas, Nitrosobolus, Nitrospira, Nitrosococcus, y Nitrosovibrio oxidan el nitrógeno amonio hasta nitrito y Nitrobacter, Nitrospira y Nitrococcus que oxidan el nitrito a nitrato. Las más activas son Nitrosomonas entre las primeras y Nitrobacter entre las segundas. Numerosos autores señalan que las bacterias nitrificantes autótrofas son las únicas responsables de este proceso oxidativo en la mayoría de los sistemas naturales (Kelly, 1978; Alexander, 1980). Sólo en aquellos hábitats donde el crecimiento autotrófico está inhibido, la microflora heterótrofa puede aumentar la concentración de nitratos en el suelo. Las bacterias de la familia Nitrobacteriaceae, a diferencia de las del grupo amonificante son aerobias y en ningún caso se conocen formas de resistencia.

#### 1.1.4. Desnitrificación

La desnitrificación consiste en la reducción de nitrato a óxidos de nitrógeno y dinitrógeno. El nitrato sirve como último aceptor de la cadena respiratoria con el subsiguiente rendimiento energético (en forma de ATP) y de las formas reducidas. Se ha comprobado que en esta secuencia de reacciones hay una liberación de pequeñas cantidades de amonio que no provienen de la reducción de nitrato, sino de la desaminación de aminoácidos (Woldendrop, 1965).

El conjunto de reacciones que forman la desnitrificación las especifica Payne (1973) como sigue:



Cada una de las distintas etapas que constituyen el proceso están catalizadas por una enzima bacteriana distinta. Sólo algunos microorganismos poseedores del juego enzimático completo pueden producir nitrógeno molecular, por lo que Ingrahan (1981) considera a éstos desnitrificantes en el sentido estricto. Lo más habitual es, sin embargo que sólo posean algunas de estas enzimas, por lo cual liberan únicamente productos intermedios de la cadena.

#### 1.1.4.a. Factores incidentes en la desnitrificación

El efecto del oxígeno sobre la desnitrificación es muy patente. Gillam et al. (1978) comprueban una mayor actividad de desnitrificación en suelos encharcados, condiciones en que se reduce la tasa de difusión de oxígeno. En las experiencias Nõmmik y Larson (1989), sobre diferentes suelos de bosque observan que las tasas de desnitrificación en suelos con un 30% de humedad descienden en un 71% con respecto a los suelos saturados.

Terry y Tate (1980) detectan actividad desnitrificante en suelos bien aireados, hecho que imputan a la presencia de microespacios anaerobios. En consecuencia en el suelo se da una simultaneidad de procesos nitrificantes y desnitrificantes ocupando aquellos microorganismos la superficie de agregados del suelo (con alta tensión de oxígeno) y éstos el interior de dichos agregados (Tate, 1985).

La temperatura afecta también a la desnitrificación. Stanford et al (1975) señalan que el proceso se bloquea por debajo de 0°C, iniciándose entre 2 y 5°C, aunque de un modo lento. La temperatura óptima, según las características del suelo, la sitúan en torno a 35 y 60°C. Entre 21 y 6°C la actividad desnitrificante en suelos incubados en laboratorio descienden en un 80% (Nõmmik y larson, 1989).

Los potenciales de desnitrificación se incrementan con el pH del suelo en un intervalo entre 3.8 y 9 (Ekpete y Cornfield, 1965; Focht 1974; Muller et al. 1980; George y Antonie, 1982) aunque puede tener lugar en un amplio margen como apuntan en sus trabajos Prakasan y Loehr (1972) y Cady y Bartholomew (1960) situandolos entre 3.5 y 11.2.

La concentración de nitrato también influye en la desnitrificación. Stanford et al. (1975), establecieron que la desnitrificación sigue una cinética de primer orden cuando el sustrato carbonado oxidable no sea limitante y la concentración de  $\text{N-NO}_3^-$  es inferior a 40 ppm. Sin embargo la cinética es de orden cero cuando el sustrato carbonado es factor limitante y las concentraciones del  $\text{N-NO}_3^-$  son mayores a 40 ppm (Starr y Parlange, 1975).

La vegetación condiciona también la actividad desnitrificante. García (1977) señala que en las raíces de *Oriza sativa*, se da una desnitrificación activa favorecida por exudados orgánicos que actúan donando protones al proceso. Mikkelsen (1987), estima que la desnitrificación es el proceso que en el arroz ocasiona mayores pérdidas de nitrógeno. También la desnitrificación esta optimizada en la rizosfera de *Alnus glutinosa* y *Elaeagnus angustifolia* aparentemente a causa de los exudados radicales (Llinares, 1993)

#### 1.1.4.b. Microorganismos desnitrificantes

La actividad desnitrificante sólo la realizan organismos procariotas (Ingraham, 1981). Existen más de 70 géneros de bacterias capaces de transformar el nitrato en gases nitrogenados. En su mayoría se trata de microorganismos anaerobios facultativos si bien hay que destacar la existencia de anaerobios estrictos (Van Gent-Kuyter et al., 1975; García, 1977).

García (1977) señala *Bacillus* como el género que más contribuye a la desnitrificación en ambientes naturales. Tiedje et al., (1984) señalan a *Pseudomonas* seguido de *Alcaligenes* y Gamble et al., (1977) a *Clostridium*.

## 1.2. Interacciones del sistema planta-suelo

Las plantas se desarrollan sobre un sustrato al que modifican tratando de acomodarse según sus requerimientos fisiológicos y las características del mismo. Como consecuencia se establece una interacción entre la planta y su sustrato. Además el medio edáfico no sólo está constituido por sustancias orgánicas e inorgánicas, sino también por un amplio conjunto de organismos. Dichos organismos con sus actividades metabólicas afectan al crecimiento y desarrollo del vegetal fundamentalmente por la producción de nutrientes, hormonas y otras sustancias que afectan a la producción primaria.

### 1.2.1. Efectos de las plantas sobre los microorganismos

El sistema edáfico, y en particular la rizosfera, es una estructura compleja en la que actúan gran número de variables. El estudio de este sistema y el de sus comunidades es sumamente complicado debido al elevado número de interacciones que en él se dan. La microflora edáfica se ve afectada de muchas formas por la planta en desarrollo y las relaciones microbianas de importancia para la fertilidad pueden ser más rápidas en el medio ambiente radicular que en el suelo no rizosférico. Por otra parte, los microorganismos interaccionan con el componente abiótico del ambiente radical alterando la naturaleza física del suelo. En definitiva el entorno de la rizosfera viene determinado por la triple interacción entre planta, suelo y microorganismos.

Remacle y De Leval (1975) ya indican que las plantas modifican las comunidades microbianas del suelo de un modo fundamental. Abundan los trabajos en este sentido poniendo en evidencia cómo distintas especies vegetales que ocupan sucesivamente un mismo ecotopo modifican cualitativa y cuantitativamente el conjunto de microorganismos edáficos. Destacan en este sentido los trabajos de Lozano y Velasco (1972) en repoblados de Pinus pinaster. Ait. en un suelo anteriormente ocupado por Quercus pyrenaica. Willd. en los que encuentran que la especie introducida modifica sustancialmente el ciclo del carbono. Estos mismos autores (1981) abundan en el tema en repoblaciones de Eucaliptus camaldulensis. Dehnn en antiguos alcornoques y encinares.

Turner y Frantz (1985) señalan que el efecto de la vegetación sobre el suelo y las comunidades microbianas que lo pueblan se verifica por cuatro vías:

- \* Aporte de diferentes compuestos a través del lavado de las partes aéreas por la lluvia.

- \* Efecto de las raíces por la liberación de exudados, secreciones, etc. en la aireación y estructura del suelo así como la composición y funcionalidad de microorganismos: efecto rizosfera.

- \* Adición de materia orgánica al suelo a través de la descomposición del lecho de hojarasca.

- \* Formación de microclimas por efecto dosel.

#### **1.2.1.a. Efecto del lavado de la parte aérea y de la hojarasca**

La lluvia, al lavar las partes aéreas de la planta (tallos, ramas y hojas) arrastra nutrientes hacia el suelo. Bollen y Lu (1968) encontraron que el agua de lluvia que ha lavado los alisos contiene de 2 a 10 veces más nitrógeno que la que ha caído sin mojar la planta.

La hojarasca incide de un modo determinante sobre los microorganismos edáficos ya que éstos al ser en su mayoría heterótrofos obtienen energía y nutrientes para su desarrollo de la materia orgánica que encuentran en el suelo, principalmente de origen vegetal (Struwe y Kjoller, 1986) . La descomposición de estos materiales depende de factores abióticos como temperatura, humedad, aireación, concentración de nutrientes y composición química de las hojas, pero también de factores bióticos como la densidad de detritívoros y descomponedores en el suelo (Daniere et al., 1986).

La materia orgánica condiciona muchas de las propiedades del medio edáfico que influyen en el sistema suelo-planta y por tanto afecta al crecimiento y desarrollo de la microflora telúrica y de la comunidad vegetal (Fresquez y Lindemann, 1982). La mera presencia de la materia orgánica favorece el desarrollo de la estructura del suelo, además la dinámica y las transformaciones de sus componentes representan el factor de influencia más importante del medio edáfico sobre la vegetación.

La riqueza en materia orgánica del suelo está determinada por dos procesos: aporte de materiales orgánicos y descomposición microbiana. La vía de entrada de materia orgánica al suelo más importante la constituyen los restos y deshechos vegetales de todo tipo: hojas, ramas, raíces, compuestos orgánicos solubles procedentes de los exudados radicales y productos de lavado de las hojas (Tiessen *et al.*, 1984), los de origen animal: cadáveres y excrementos constituyen un aporte secundario. Franklin y Waring (1980) calculan que las cantidades de fragmentos de troncos caídos al suelo en bosques de coníferas puede exceder las 500 t ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup> y alcanzar entre el 10 y el 25% de la biomasa total.

Los microorganismos edáficos mediante su actividad biológica, constituyen la principal vía de salida de materia orgánica del sistema. El rendimiento de la mineralización fluctúa debido a la considerable variabilidad en la composición de la materia orgánica, y al tipo de microflora que ejerce el efecto degradativo, pero se puede considerar que, en términos generales, entre el 60-70% de los sustratos orgánicos depositados por las plantas en el intervalo de un año es mineralizado por la microflora telúrica (Haider, 1986).

Las plantas diazotrofas a través del lecho de hojarasca influyen considerablemente en las poblaciones de microorganismos del suelo, de un modo especial sobre los implicados en procesos relacionados con el ciclo del nitrógeno. Esto es así porque las hojas de estas plantas tienen alto contenido en nitrógeno. Silvester (1977) realiza una revisión de trabajos de distintos autores en la que se aprecia cómo especies actinorrizas presentan porcentajes dobles de nitrógeno en sus hojas que otras especies. Tal es el caso de Alnus con Betula sp, Tilia cordata Miller, Acer platanoides L., Corylus avellana L., Pinus sylvestris L., Picea sp. y Tsuga sp.

La estructura y composición del lecho de hojarasca regula la tasa de mineralización por lo que incide de forma decisiva en la producción primaria de los ecosistemas (Hunt *et al.*, 1988). Los restos vegetales de coníferas se descomponen con lentitud ya que contienen una baja proporción en nutrientes como N y P (Cowling y Merrill, 1966). Debido a la alta concentración de compuestos nitrogenados que contienen las hojas de las plantas diazotrofas, su descomposición es relativamente rápida, además constituye una vía de entrada de nitrógeno muy importante para el ecosistema (Llinares, 1993).

El aporte de N por estas vías en suelos donde las plantas actinorrizas aparecen como dominantes es considerable, por ejemplo; diversas especies de los géneros que a continuación se mencionan proporcionan las siguientes cantidades de N Kg ha<sup>-1</sup> año<sup>-1</sup>: Alnus 36-325, Coriaria, 192; Hippophae, 56-197; Casuarina, 58; Ceanothus, 60-140; Dryas, 12 (Bermúdez de Castro, 1981); Elaeagnus angustifolia L., 34,5 y Myrica gale, 9-34 (Bond, 1951; Schwintzer, 1979).

#### 1.2.1.b. Efecto rizosfera: exudados radicales

La interacción entre la planta y su sustrato se establece con mayor o menor intensidad por diversas vías, señaladas anteriormente. Sin embargo la relación establecida entre la planta y el suelo a través del sistema radical ha merecido especial atención por parte de numerosos investigadores. Existen para ello poderosas razones entre las que podemos destacar:

- \* La importancia que desde un punto de vista fisiológico tiene el aparato radical en el desarrollo y crecimiento de la planta.

- \* La considerable superficie de contacto entre el suelo y la planta a través del sistema radical.

- \* El complejo entramado de señales moleculares entre la raíz y la biocenosis circundante.

En 1904, Hiltner define la rizosfera como aquella porción del suelo en torno a la raíz de leguminosas, con una mayor actividad microbiana. Hiltner señala que la nutrición de la planta depende de la flora rizosférica. Posteriormente este concepto fue redefinido y actualmente se considera rizosfera la porción suelo influida por las raíces vivas. Son muchos los autores que a partir de 1904 se han dedicado al estudio de la rizosfera, cabe destacar, entre otros, los trabajos de Starkey (1929) en los que demuestra los principales efectos de la planta en crecimiento sobre los microorganismos edáficos, los de Rovira, 1959; Vancura, 1964; Rovira y Bowen, 1966 y Rovira et al. 1979, sobre la naturaleza y el papel de los exudados en la rizosfera y toda una serie de trabajos y revisiones sobre las propiedades y características de esta región edáfica. Todos estos trabajos nos permiten actualmente considerar el "efecto rizosfera" como una de los factores clave que afectan a la producción primaria (Russell, 1977; Foster y Rovira, 1978; Domergues y Krupa, 1978; Rovira, 1979; Bennet y Lynch, 1981; Cook y Baker, 1983; Lynch, 1983; Curl y Truelove, 1986; Wild, 1988).



Por todo lo expuesto podríamos señalar que la rizosfera es la zona en la cual suelo y planta se encuentran en contacto de un modo más íntimo y donde las poblaciones microbianas se ven afectadas por los productos orgánicos liberados las raíces. Estos productos orgánicos se suelen agrupar bajo el nombre genérico de "exudados" pero en un sentido estricto (véase Tabla 1.I) comprende exudados, secreciones, mucilagos, mucigeles y lisados celulares (Rovira et al., 1974). Lynch (1987), estima que hasta un 40% del total de los fotosintatos pueden perderse por las raíces y servir de sustrato a los microorganismos, que actúan como un sumidero y de ahí el impacto de estos en la producción primaria.

Las plantas modifican las comunidades microbianas del suelo de un modo fundamental, tanto cualitativa como cuantitativamente (Remacle y De Leval, 1975). Alexander (1980) observa como diferentes especies de plantas en un mismo tipo de suelo presentan rizosferas muy diversas, mientras que la rizosfera de una misma especie cultivada en suelos de características muy diversas fluctúa sólo moderadamente.

El aparato radical de la planta determina parcialmente la composición mecánica y mineral del suelo de varias formas: acelera la disgregación de los minerales, sobre todo en las fracciones de arcilla menos voluminosas (Sarkar et al., 1979), modifica el estado de agregación del suelo a través de interacciones físicas, químicas y biológicas (Harris et al., 1966) y altera las uniones físicas de las partículas del suelo mediante la liberación de sustancias orgánicas radicales, sobre todo polisacáridos (Monroe y Klauduko, 1987) aumentando la estabilidad de los agregados telúricos (Reid y Goss, 1980). Las características fisicoquímicas de los agregados que constituyen la estructura del suelo son un factor importante que influye en el desarrollo de las raíces, y en su capacidad de exudación ya que determina características como la porosidad y por tanto la aireación, el potencial hídrico y la transferencia de calor.

La planta, al mismo tiempo, asimila nutrientes inorgánicos disminuyendo de este modo la concentración disponible para el desarrollo microbiano. Los microorganismos también se ven afectados por la respiración radicular, que incrementa las concentraciones de CO<sub>2</sub> en esta zona. Conforme crece la raíz, las partículas de suelo se desplazan creándose una zona entorno a las raíces donde el suelo es más denso. Este hecho afecta directamente al crecimiento bacteriano, aunque dicho efecto varía según el tipo de suelo, potencial hídrico, la relación

CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>, y otros factores. En esta zona suele existir O<sub>2</sub> suficiente para las funciones microbianas, a excepción de los suelos encharcados. Si las cantidades de O<sub>2</sub> son bajas aumentan los daños a la raíz. Del mismo modo las altas concentraciones de CO<sub>2</sub> constituyen un factor limitante para el crecimiento de algunos microorganismos. La penetración de las raíces también mejora la estructura del suelo y estas relaciones estructurales mejoran las oxidaciones microbianas.

El pH en la rizosfera tiende a ser más ácido que en el resto del suelo debido a la producción de CO<sub>2</sub> y ácidos orgánicos por las raíces, así como por la captación de cationes de cambio y aniones por la planta (Nye, 1981). El pH de la rizosfera suele diferir en 1 o 2 unidades del suelo no rizosférico, esto afecta a las bacterias y algunos hongos.

A continuación se expone una revisión de uno de los principales factores responsables del efecto rizosfera: los exudados radicales considerando la acepción genérica del término:

---

---

Tabla 1.I. Clasificación de los exudados.

---

<b>Exudados</b>	Compuestos químicos y metabolitos originados en la superficie o interior de la raíz.
<b>Exudaciones</b>	Proceso de liberación de exudados, que implica diversas rutas y mecanismos bioquímicos.
<b>"Leakages"</b>	Compuestos de bajo peso molecular que difunden al apoplasto y a través de éste a la superficie de la raíz o directamente a células epidérmicas o corticales.
<b>Secreciones</b>	Compuestos que cruzan la membrana, con gasto energético.
<b>Mucílagos</b>	Incluye sustancias derivadas de las células de la caliptra, polisacáridos hidrolizados de la pared primaria de las células, secreciones epidérmicas o de los pelos radicales y productos de degradación bacteriana de células muertas.
<b>Lisados</b>	Productos liberados por autólisis de células radicales senescentes.

Fuente: Desarrollado desde Hale *et al.* (1981).

Vancura (1964) y Rovira (1969) resumen los factores que afectan a la exudación en cuatro grandes grupos: fisiológicos (tipo de planta, edad, nutrición, etc.), patológicos, los debidos a modificaciones del entorno físico (luz, temperatura, humedad, etc.) y la microflora asociada a la rizosfera. Son muchos los estudios que vienen a refrendar esta clasificación. La edad de la planta, y su estado fisiológico son características que afectan decisivamente en la composición cualitativa y cuantitativa de los exudados radicales (Smith, 1970; Hamlen et al., 1972; Vancura y Hovadik, 1965; Lynch, 1990) y por lo tanto son factores que influyen en la magnitud del efecto rizosfera (Pozuelo, 1991). Así Hamlen et al. (1972) encuentran que la cantidad de carbohidratos exudados por la alfalfa aumentan con la edad de ésta. Por su parte, Klein et al. (1989), demuestran que en diferentes estudios de una serie de vegetación, se dan modificaciones en las características de los exudados, que es resultado de la disponibilidad de nutrientes.

La humedad del suelo influye en la composición y en los niveles de los materiales orgánicos que excretan las raíces. El estrés hídrico es uno de los factores que induce la exudación radical. El número total de bacterias suele ser mayor en suelos que han sufrido un período de estrés puesto que encuentran en ellos mayor cantidad de materiales orgánicos solubles en agua que proceden sobre todo de la autólisis de células radicales (Martin, 1977b). Además la desecación del suelo afecta a la viabilidad de las raíces jóvenes que constituyen una fuente adicional de sustratos carbonados.

La composición de los exudados (Tabla 1.II.) ha sido pormenorizadamente estudiada por distintos autores como Vancura y Hovadik (1965) que encuentran en los exudados de diversas plantas aminoácidos, ácidos orgánicos y azúcares de muy distintos tipos. También se han detectado esteroides, factores de crecimiento, nucleótidos, flavonas, enzimas y hormonas (Curl y Truelove, 1986). Los compuestos orgánicos volátiles (en su mayoría aldehídos y alcoholes) difunden rápidamente de forma que las concentraciones de estos compuestos en la rizosfera son muy bajas, a pesar de lo cual influyen en la microflora rizosférica. Estos compuestos parecen inhibir muchos patógenos de plantas (Coley-Smith y King, 1970; Krupa y Nylund, 1972). Una variable crítica que afecta las características de los exudados, es precisamente la disponibilidad de nitrógeno. Así Griffin et al. (1976), establecieron en plantas de maní que los exudados variaban su razón C/N en función de la disponibilidad de nitrógeno

en el medio (9:1 si se hacía crecer a la leguminosa en medio A-Z de Hoglans o 18.9:1 si crecían en el mismo medio sin sales nitrogenadas). Este hecho es importante puesto que la razón C/N afecta a la capacidad de colonización de distintos grupos de microorganismos en la rizosfera, los cuales a su vez modifican cualitativa y cuantitativamente la exudación. Clarholm (1985) señala que exudados con elevada razón C/N estimulan la mineralización.

---

---

Tabla 1.II. Sustancias detectadas en los exudados radicales de distintas plantas

<u>Clase de Compuesto</u>	<u>Composición</u>
<b>Azúcares</b>	Glucosa, fructosa, sucrosa, maltosa, galactosa, rhamnosa, ribosa, xilosa, arabinosa, rafinosa, oligosacáridos y distintos polisacaridos.
<b>Compuestos aminados</b>	Asparagina, $\alpha$ -alanina, glicina, cistina/cisteína, metionina, fenilalanina, tirosina, treonina, lisina, prolina, triptófano, $\beta$ -alanina, arginina, homoserina, cistationa.
<b>Ácidos orgánicos</b>	Tartárico, oxálico, cítrico, málico, acético, propiónico, butírico, succínico, fumárico, glicólico, valérico, malónico.
<b>Ácidos grasos y esteroides</b>	Palmítico, esteárico, oleico, linoleico, colesterol, campesterol, estigmasterol, sitosterol.
<b>Factores de crecimiento</b> ácido n-metil nicotínico.	Biotina, tiamina, niacina, pantotenato, colina, inositol, piridoxina, paraminobezoico,
<b>Nucleótidos, flavonas y enzimas</b>	Flavonas, adenina, guanina, uridina, citidina, fosfatasa, amilasa, proteasa, galactouranasa.
<b>Otros compuestos</b>	Auxinas, sustancias fluorescentes, ácido cianhídrico, glicósidos, saponinas, compuestos orgánicos fosforados, compuestos que afectan a nemátodos, estimuladores e inhibidores de crecimiento fúngico, estimuladores e inhibidores de bacterias, de germinación de esporas y esclerocios, etc.

---

---

Fuente: Curl y Truelove (1986).

Como resultado del aporte de materia orgánica a través de las raíces, la rizosfera es rica en microorganismos. Rovira y Davey (1974) y Brown (1975) estiman que la densidad bacteriana es entre 5 y 10 veces mayor en la rizosfera. Los microorganismos usan los productos liberados por las raíces como sustrato (Krotzky et al., 1986). Pero esta variación es también cualitativa, por el efecto alelopático de los distintos compuestos orgánicos de los exudados y por la acomodación al ambiente rizosférico, como se desprende de los trabajos de Bowen y Foster (1978), en los que comprueban que los tiempos de generación de Pseudomonas sp. y Bacillus sp. creciendo en la rizosfera son de 5.2 y 39 horas respectivamente en tanto que fuera de ella hay una generación cada 77 y 100 horas. En este sentido también podemos mencionar los dos isoflavonoides (cumestrol y daizeína), que D'Arcy y Jay (1987) encuentran como inhibidores (Pseudomonas sp. o Agrobacterium tumefaciens) o estimuladores (Rhizobium japonicum y R. meliloti) producidos por leguminosas.

Los microorganismos metabolizan con facilidad las sustancias solubles, azúcares y aminoácidos, y provocan un cambio cualitativo importante en la rizosfera por aumento de CO<sub>2</sub> y de los productos que resultan de su metabolismo. Además los niveles de compuestos no difusibles en torno a la raíz aumentan y la microflora que coloniza las raíces puede utilizarlos (Leppard, 1974). Las bacterias son más eficaces que los hongos utilizando los compuestos de peso molecular bajo. Estas sustancias constituyen una parte importante de los exudados radicales y son poco abundantes en las primeras etapas descomponedoras de los restos vegetales muertos. Los hongos son más eficaces en las primeras etapas de descomposición de las raíces muertas por metabolizar rápidamente los polímeros de alto peso molecular, (Nakas y Klein, 1980). Tales características metabólicas justifican que las bacterias dependan sobre todo de los exudados radicales.

Los compuestos orgánicos liberados por las raíces constituyen un sustrato adecuado para una gran variedad de microorganismos. Existe una correspondencia entre las cantidades y tipos de aminoácidos u otros componentes orgánicos exudados por la raíz y las poblaciones de microorganismos rizosféricos (Rovira y Davey, 1974; Hale et al., 1978). Según algunos autores las rizobacterias predominantes son las Gram negativas y entre estas las más abundantes son Pseudomonas sp. (Alstrom, 1987), en su mayoría Pseudomonas fluorescens (Burr y Caesar, 1984), Achromobacter sp., Alcaligenes sp.,

Nocardia sp., Enterobacter sp. y Flavobacterium sp. (Brown, 1972). Por el contrario en suelos sin raíces predominan las bacterias Gram positivas (Chan et al., 1963).

Las plantas actinorrizas ejercen una notoria influencia sobre microorganismos cercanos a sus raíces. Plantas como el aliso estimulan el crecimiento de Streptomyces sp., Penicillium sp. y Aspergillus sp. e inhibe hongos fitopatógenos como Poria weirii o Fomes annosus, gracias a la liberación de productos como: polifenoles, aminoácidos, taninos y otros compuestos nitrogenados (Bollen y Lu, 1968; Tarrant y Trappe, 1971). Del mismo modo, Danière et al. (1986) encuentra que Alnus incana favorece el crecimiento de microorganismos amonificantes y nitrificantes de suelos de bosque europeos; por su parte Bermúdez de Castro et al. (1984) en sus estudios en alisedas riparias de Alnus glutinosa, encuentra que esta betulacea estimula la presencia de nitrificantes nítricos y nitrosos.

En general, una elevada exudación revierte en un incremento de la demanda de oxígeno por parte de los microorganismos rizosféricos, lo que en combinación con la respiración de las raíces, convierte el medio rizosférico en lugar idóneo para grupos fisiológicos determinados, como los desnitrificantes: Por una parte los aminoácidos exudados suponen un sustrato favorable para este proceso, como muestran Bailey y Beauchamp (1973) al encontrar un aumento de la actividad desnitrificante en suelos enriquecidos con macerados de maíz. Por otra parte la mayor disponibilidad de sustratos carbonados así como de nitratos estimula las tasas de desnitrificación (Smith y Tiedje, 1979; Bremner y Shaw, 1958). Arima y Yoshida (1982) en sus estudios en Oriza sativa L., Juncus effesus L. y otros, encuentran que la rizosfera es el lugar óptimo para el desarrollo de la microflora diazotrófica, dada la gran disponibilidad de sustratos carbonados y la existencia de zonas microaerobias, que sirven de estímulo quimiotáctico para bacterias microaerófilas (Barak et al., 1983).

Compuestos aromáticos liberados por exudación pueden incidir positivamente en la fijación de nitrógeno (Werner et al., 1982; Krotzky et al., 1983) al activar la enzima nitrogenasa. Merecen mención especial la rizosfera de plantas noduladas fijadoras de nitrógeno atmosférico en simbiosis con bacterias (actinorrizas o bacteriorrizas). Así, Van Egeraat (1979) y Forester y Rovira (1978) registran una elevación del número de poblaciones microbianas y de la microflora total a medida que los recuentos se efectúan a menor distancia de la raíz.

Las fitohormonas también son productos expulsados por los nódulos de actinorrizas. En este sentido, Dullaart (1970) encuentra auxinas y Bermúdez de Castro (1976) así como Rodríguez-Barrueco *et al.*, (1979) encuentran citoquininas en altas concentraciones. Estas hormonas están implicadas en procesos de la nodulación.

Los compuestos de carácter alelopático son también fundamentales en la colonización y desarrollo de los microorganismos de la rizosfera (Rice, 1984; French, 1985). Se ha establecido un importante grupo de metabolitos producidos por las raíces en respuesta a los microorganismos que recibe el nombre de Fitoalexinas (Ebel, 1986). Estas sustancias, definidas como compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular, son estructuralmente fenilpropanoides o isoprenoides. Estos compuestos están producidos como respuesta a microorganismos específicos, o indirectamente por "Elicitores". Hay gran variedad de elicitores descritos e incluyen: hidratos de carbono complejos, células fúngicas o vegetales, lípidos y enzimas microbianas, polipéptidos, entre muchos otros, pero también hay elicitores abióticos como son las bajas temperaturas, la luz ultravioleta, la desecación, metales pesados, detergentes y otros.

Otro grupo de metabolitos exudados por las plantas son las aglutininas, o más específicamente Fitoaglutininas. Estos compuestos sirven al vegetal como agentes antimicrobianos (Mansfield y Brown, 1988) y juegan un importante papel en la colonización de la rizosfera (Anderson *et al.*, 1988).

La aplicación de fertilizantes minerales incrementa la flora microbiana en la rizosfera de muchas plantas (Rovira, 1965; Katznelson, 1965). El efecto de los fertilizantes sobre la microflora edáfica puede ser directo o indirecto. Como consecuencia de la fertilización, se produce un aumento en el crecimiento de la planta acompañado de un cambio cualitativo y cuantitativo de la exudación. Bowen (1969) observa un aumento significativo en la cantidad de aminos y aminoácidos exudados por las raíces de pino creciendo en un suelo fertilizado, lo que influye en las interacciones microorganismo-planta.

Los factores ambientales influyen en la exudación radical y por tanto en la actividad de la microflora edáfica. Cambios en la temperatura y humedad del suelo se reflejan claramente en cambios de las poblaciones microbianas (cambios estacionales) (Thrower, 1954; Barclay y Crosse, 1974; Acero, 1993). Se pueden observar cambios de las poblaciones bacterianas con el tiempo, incluso cuando los factores ambientales son relativamente constantes.

### 1.2.2. Efectos de los microorganismos sobre las plantas

#### 1.2.2.a. Organismos rizosféricos

La comunidad rizosférica está formada principalmente por microorganismos: bacterias, hongos, protozoos y microalgas aunque también está representada la microfauna: nemátodos y ácaros. Generalmente la cantidad de bacterias es superior a la de hongos que a su vez es mayor que la de protozoos y algas y éstos a su vez que la microfauna (Katznelson, 1965). Este orden de densidades relativas de organismos no difiere de lo encontrado en el suelo no rizosférico, ni varía según la especie de planta pero el número absoluto de organismos sí cambia (Tabla 1.III).

Tabla 1.III. Poblaciones de microorganismos a varias distancias de la superficie radical de plántulas de altramuza.

Distancia de la raíz (mm).	Bacterias <sup>(a)</sup>	Streptomyces <sup>(a)</sup>	Hongos <sup>(a)</sup>
0 <sup>(b)</sup>	159000	46700	355
0-3	49700	15500	176
3-6	38000	11400	170
9-12	37400	11800	130
15-18	34170	10100	117
80 <sup>(c)</sup>	27300	9100	91
Razón R/S <sup>(d)</sup>	5.8	5.1	3.9



---

<sup>(a)</sup>: Aparecen en millares de unidades formadoras de colonias por gramo de suelo seco.

<sup>(b)</sup>: Rizoplano.

<sup>(c)</sup>: Razón R/S: nº de microorganismos en el rizoplano / nº de microorganismos en suelo no rizosférico.

Fuente: Papavizas y Davey (1961)

---

Los estudios ecológicos de colonización microbiana indican que las bacterias se distribuyen irregularmente en el rizoplano en función del tipo de planta, de suelo y de las especies de microorganismos (Asanuma *et al.*, 1979). Los polisacáridos y glicoproteínas de la superficie radical constituyen una matriz delgada de fibrillas que engloba gran número de organismos (Elliot *et al.*, 1979). Esta matriz constituye el soporte físico en el cual se realiza la absorción de nutrientes y las reacciones básicas de transformación de los precursores que se transformaran en los nutrientes asimilables por el vegetal. Por lo tanto la estructura de esta zona tanto física como biológica y los factores que afecten a su funcionamiento tendrán un efecto decisivo sobre el desarrollo de la planta. Ligados a esta capa mucilaginosa los microorganismos se localizan, según Bowen (1979), preferentemente en las uniones intercelulares y en los lugares de alta exudación recubriendo solo el 10% de la superficie radical (Bowen, 1981), mientras que para Bennet y Lynch (1981) se localizan por igual en las zonas de contacto entre células y en la superficie de las células epidérmicas.

Por otra parte cabe destacar el efecto de la fauna rizosférica. Está constituida principalmente por nemátodos, ácaros y colémbolos y en menor proporción por protozoos y larvas de pequeños insectos. Podemos encontrar en la rizosfera tanto nemátodos de vida libre como parásitos de plantas. La mayoría son de vida libre pero están asociados a plantas, alimentándose superficialmente de tallos y raíces, bacterias, hongos y algas (Jones, 1959). Las formas parásitas son en su mayoría endoparásitos, como *Heterodera* spp., o ectoparásitos, como *Tylenchus* y *Dorylaimus* spp. Los nemátodos a su vez sirven de alimento a pequeños ácaros que también se alimentan de bacterias y constituyen en ocasiones parásitos de plantas. En resumen, el efecto de la microfauna sobre la planta es tanto directo (parásitos), como indirecto a través de las interacciones con bacterias y de la propia microfauna entre sí.

Otra propiedad de algunas bacterias, beneficiosa para la planta, es la capacidad de controlar patógenos, bien mediante antagonismos o competencia (Burr y Caesar, 1984; Schroth et al., 1984; Gaskins et al., 1985; Davison, 1988). Muchas bacterias y en particular Pseudomonas y Bacillus son capaces de controlar patógenos, sobre todo hongos. Algunas especies de estos géneros se usan, así mismo, como pesticidas de algunos lepidópteros en el suelo (Watrud et al., 1985).

Mención especial requieren las simbiosis entre raíces y microorganismos fijadores de nitrógeno y entre raíces y micorrizas. En ambos casos las plantas representan la fuente de sustratos carbonados y obtienen a cambio un aporte significativo de nutrientes, principalmente nitrógeno y fósforo. Mediante la fijación de nitrógeno bacterias como Rhizobium y Bradyrhizobium spp. aumentan la cantidad de nitrógeno disponible para algunas leguminosas (Alexander, 1984). Frankia spp. fija de nitrógeno en plantas como Alnus sp. (Sheppard et al., 1989), Myrica sp. Elaeagnus sp etc. Otras bacterias, como Bacillus polymyxa, Bacillus megaterium o Pseudomonas fluorescens incrementan la disponibilidad de P para las plantas (Brown, 1974).

Los microorganismos, tanto en el suelo no rizosférico como en la rizosfera están expuestos a un amplio rango de temperaturas que varía según la cobertura de la planta, la humedad del suelo y la profundidad (Griffin, 1972). El efecto de la temperatura sobre la actividad microbiana en la zona radicular es más bien indirecto, este factor controla el crecimiento de la planta así como la naturaleza y cantidad de exudados radicales. Puesto que los exudados también varían con las distintas especies de plantas, una misma temperatura afectará de modo distinto a las distintas especies de plantas (Rouatt et al., 1963). El número de bacterias Gram negativas decrece conforme aumenta la temperatura. Sin embargo las Gram positivas se comportan de forma opuesta a las anteriores. El efecto rizosfera para la cebolla, es más pronunciado a 25°C que a 18° o 16°C (Fenwick, 1973), sin embargo esta temperatura (25°C) no es la temperatura óptima de crecimiento para la cebolla (16°C). El número de bacterias amonificantes es mayor a altas temperaturas.

### 1.2.2.b. Sustancias microbianas que afectan a las plantas

Cualquier sustancia benéfica o tóxica producida por la microflora rizosférica puede causar un efecto inmediato y profundo sobre la planta. Por lo tanto las modificaciones en la abundancia de microorganismos o en las proporciones relativas de grupos individuales afectarán a su vez a la planta a través de las relaciones catalizadas microbiológicamente. La capacidad de los microorganismos edáficos para sintetizar muy distintos tipos de metabolitos afectan a las propiedades del suelo a la composición química de éste y a las plantas que en él se desarrollan. Son muchos los ejemplos que se pueden citar a ese respecto.

El conjunto de sustancias que afectan de un modo directo (metabolitos bacterianos que actúan sobre la planta) o indirectamente (metabolitos que actúan sobre otros microorganismos rizosféricos, beneficiosos o patógenos) se pueden resumir en ocho grupos:

a) Reguladores del crecimiento vegetal (fitohormonas): Se ha observado que hay un gran grupo de microorganismos capaces de producir "in vitro" e "in vivo" varios tipos de fitohormonas. Algunas especies de Pseudomonas, Azospirillum, Azotobacter, Bacillus, favorecen el crecimiento de la planta mediante la producción de hormonas como el ácido indol-acético (IAA), giberelinas, o citoquininas en la rizosfera de las plantas cuando éstas están en estado de plántula (Brown, 1974; Nieto y Frankenberger, 1989). Factores ambientales como el tipo de suelo, temperatura, humedad y pH, tipo de planta e intensidad de la luz, determinan la liberación y el efecto de estas hormonas.

b) Fitotoxinas: Compuestos que, a bajas concentraciones, inhiben el crecimiento y desarrollo de plantas.

c) Vitaminas: El crecimiento de raíces de plantas cultivadas en medios sintéticos depende en muchas ocasiones de la adición de una o varias vitaminas como la tiamina, ácido nicotínico y/o piridoxina. En condiciones naturales es difícil estudiar la captación de vitaminas por las plantas, en este sentido algunos fisiólogos vegetales han señalado la existencia de cierta heterotrofia a este respecto (Buström, 1965).

d) Ionóforos: Se trata de compuestos de origen bacteriano o fúngico capaces de quelar hierro y otros metales (Neillands, 1977). El efecto de estos compuestos sobre las plantas es, en unos casos, indirecto al actuar sobre otros microorganismos patógenos o beneficiosos de plantas como el encontrado por Gill y Warren (1988) en Pseudomonas sp., que actúa sobre el hongo patógeno Phytium ultimum. En otras ocasiones es directo, actuando sobre la planta; así Becker et al. (1985) encuentra que la Pseudobactina (sideróforo producido por Pseudomonas aureofaciens ATCC 15926) inhibe la captación del ion férrico por las raíces de guisante y maíz en un grado tal que se reduce la síntesis de clorofila.

e) Antibióticos: Los microorganismos rizosféricos producen antibióticos con el fin de reducir competidores en el medio en el que se desarrollan. Estos metabolitos microbianos actúan sobre la planta de un modo indirecto (actuando sobre patógenos de vegetales): por ejemplo Howell y Stipanovic (1979) encontraron que la cepa Pf-5 de Pseudomonas fluorescens produce pioluteorina, antibiótico eficaz de un hongo patógeno del algodón (Phytium ultimum).

f) Lectinas y aglutininas: las aglutininas son azúcares o glicoproteínas (actualmente llamadas lectinas) que se combinan con receptores específicos (mono u oligosacáridos) de la célula hospedadora (de planta o microbiana). Claramente las lectinas poseen un considerable papel mediando la adherencia a superficies radicales de microorganismos determinados.

g) Agentes agregantes del suelo: Los agregados edáficos son formados principalmente por fuerzas físicas. Sin embargo junto a éstas aparecen otros elementos que conducen a la formación de agregados edáficos. Es bien conocido que la rizodeposición proporciona un mejor sustrato para la estabilización del suelo por los microorganismos, que contribuyen por ejemplo, a la rápida formación de agregados en suelos de pastizales (Lynch y Bragg, 1985)

h) Enzimas: Se han identificado mas de 50 enzimas activas en el suelo (que incluyen entre otras oxidoreductasas, transferasas, hidrolasas y liasas) procedentes tanto de microorganismos rizosféricos como de los propios vegetales. Estos agentes catalíticos son inmovilizados en el suelo por arcillas, huminas y constituyen un biocatalizador extra celular persistente (Burns, 1983)

En la tabla 1.IV se ha realizado una revisión de los diferentes grupos de metabolitos microbianos que pueden afectar a las plantas.

Tabla 1.IV: Sustancias producidas por microorganismos rizosféricos que afectan a especies vegetales directa o indirectamente.

Tipo de sustancia	Compuesto	Microoorganismos
<b>Reguladores del crecimiento:</b>		
Auxinas	Ac. 3-indolacético	<u>Azotobacter paspali</u> <u>Azospirillum brasilense</u> <u>Rhizobium trifolii</u> <u>Rhizobium leguminosarum</u> <u>Pseudomonas fluorescens</u> <u>Pseudomonas putida</u> <u>Bacillus</u> sp.
	Indol-3-acetamida Ac. indol-3-láctico Indol-3-acetaldehído	<u>Pseudomonas</u> sp. <u>Pseudomonas</u> sp. <u>Pseudomonas</u> sp.
Giberelinas	Ac. Giberélico	<u>Azotobacter chroococcum</u> <u>Azotobacter beijerinckii</u> <u>Azotobacter vinelandii</u> <u>Azotobacter paspali</u> <u>Pseudomonas</u> sp.
Citoquininas	Kinetina	<u>Pseudomonas</u> sp <u>Agrobacterium tumefaciens</u> <u>Corynebacterium fasciens</u> <u>Rhizobium leguminosarum</u> <u>Escherichia coli</u> Levaduras Actinomicetos Hongos
Acido abscísico		<u>Cercospora rosicola</u>
Etileno		Hongos <u>Pseudomonas putida</u> <u>Pseudomonas fluorescens</u>
<b>Fitotoxinas:</b>		
Acidos alifáticos:	Acético Propiónico Butírico	Amplio grupo de microorganismos anaerobios.
Acidos fenólicos	Ac. p-hiroxibenzoico Ac. p-cumarico Ac. Syringico Ac. Ferúlico	<u>Pseudomonas</u> sp. <u>Pseudomonas</u> sp. <u>Pseudomonas</u> sp. <u>Pseudomonas</u> sp.

Tabla 1.IV (Continuación): Sustancias producidas por microorganismos rizosféricos que afectan a especies vegetales directa o indirectamente.

Tipo de sustancia	Compuesto	Microorganismos
<b>Fitotoxinas (continuación).</b>		
Acido sulfhídrico		<u>Desulfotomaculum</u> sp. <u>Desulfovivrio</u> sp. <u>Desulfomonas</u> sp. <u>Desulfuromonas</u> sp.
Acido cianhídrico		<u>Chromobacterium</u> <u>volaceum</u> <u>Pseudomonas</u> <u>aeruginosa</u> <u>Pseudomonas</u> <u>fluorescens</u> <u>Pseudomonas</u> <u>chloraphis</u> <u>Pseudomonas</u> <u>aurofaciens</u> <u>Marasmius</u> <u>odeades</u> <u>Clorella</u> <u>vulgaris</u>
<b>Vitaminas:</b>		
	Biotina	<u>Pseudomonas</u> sp. <u>Bacillus</u> sp.
	Acido nicotínico	<u>Pseudomonas</u> sp. <u>Bacillus</u> sp.
	Acido pantoténico	<u>Pseudomonas</u> sp. <u>Bacillus</u> sp.
	Tiamina	<u>Pseudomonas</u> sp. <u>Bacillus</u> sp.
	Cobalamina	<u>Pseudomonas</u> sp. <u>Bacillus</u> sp.
<b>Ionóforos:</b>		
	Enterobactina	Enterobacteriacas
	Parabactina	<u>Paracoccus</u> <u>denitrificans</u>
	Vibriobactina	<u>Vibrio</u> <u>cholerae</u>
	Esquizoquina	<u>Bacillus</u> <u>megaerium</u> <u>Anabaena</u> sp.
	$\alpha$ $\epsilon$ -bis-2,3-dihidroxi benzoil lisina	<u>Pseudomonas</u> sp.

Tabla 1.IV (Continuación): Sustancias producidas por microorganismos rizosféricos que afectan a especies vegetales directa o indirectamente.

Tipo de sustancia	Compuesto	Microorganismos
<b>Ionóforos (continuación):</b>		
	Pyochelina	<u>Pseudomonas</u> sp.
	Ploverdina	<u>Pseudomonas</u> sp.
	Pseudobactina	<u>Pseudomonas</u> sp.
	Ferribactina	<u>Pseudomonas</u> sp.
	Ferrioxaminas	<u>Actinomyces</u> sp.
	Ferricromos	Ascomicetes y basidiomicetes.
	Ac. Rodoturfilico	<u>Rodotorula</u> sp.
<b>Antibióticos:</b>		
	Agrocin 84	<u>Agrobacterium rhizogenes</u>
	Patulina	<u>Penicillium patulum</u> <u>Aspergillus clavatus</u> <u>Aspergillus terreus</u>
	Pioluteorina	<u>Pseudomonas fluorescens</u>
	Pirrolnitrina	<u>Pseudomonas fluorescens</u>
	6n-pentil-2H-piran-2-ona	<u>Trichoderma harzianum</u> <u>Trichoderma koningii</u>
	Gliovirina	<u>Gliocladium virens</u>
	Ac. Fenzin-1-Carboxílico.	<u>Pseudomonas fluorescens</u>
<b>Lectinas y Aglutininas:</b>		<u>Klebsiella</u> sp. <u>Enterobacter</u> sp. <u>Agrobacterium tumefaciens</u> <u>Sclerotium rolfsii</u> <u>Rhizoconia solanii</u> <u>Enterobacter cloacae</u> <u>Trichoderma</u> sp.

Tabla 1.IV (Continuación): Sustancias producidas por microorganismos rizosféricos que afectan a especies vegetales directa o indirectamente.

Tipo de sustancia	Compuesto	Microorganismos
<b>Agentes agregantes del suelo:</b>		<u>Enterobacter cloacae</u> <u>Trichoderma harzianum</u> <u>Sordaria alcina</u>
<b>Enzimas:<sup>(a)</sup></b>		
Oxidoreductasas	Ureato oxidasa	
	Catecol oxidasa	
	Lacasa	
	Peroxidasa	
	Monofenol monooxygenasa	
Transferasas	Dextranosucrosa	
	Levanosucrosa	
	Tiosulfato sulfurotransferasa	
Hidrolasas	$\alpha$ -amilasa	
	$\beta$ -amilasa	
	Celulasa	
	Xilanasa	
	$\beta$ -glucosidasa	
	Peptidasa	
	Asparaginasa	
	Glutaminasa	
	Amidasa	
	Fosfatasa ácida	
	Fosfatasa alcalina	
	Carboxilasa	
Liasas	Glutamato descarboxilasa	
	Tirosina descarboxilasa	

Fuente: condensado de Lynch (1990))  
(a): Amplio grupo de microorganismos.



### 1.3. Alnus glutinosa

El aliso -Alnus glutinosa (L.)Gaertner-, se encuentra encuadrado taxónomicamente en el orden fagales, dentro de la familia Betulaceae. Se trata de un árbol de tamaño medio que no suele exceder de los 20 m de altura, aunque se conocen ejemplares de 30 m, y que se desprende de sus hojas para pasar el invierno.

El tronco es derecho de casi 1 m de diámetro, con corteza pardo-oscura resquebrajada, casi lisa y de color pardo-grisacea o pardo-rojiza en ejemplares jóvenes. La copa es al principio casi piramidal y más tarde redondeada o irregular, con las ramas abiertas y ramillas lampiñas y pegajosas.

Las hojas de 4 a 10 cm, con peciolo bien desarrollado, de color verde oscuro por el haz y más claro por el envés, donde suele llevar mechones de pelillos en el encuentro de los nervios. Son de forma redondeada, elípticas u obovadas, de borde sinuoso, recorrido por numerosos dienteclillos y terminación roma o escotada. Son de filotaxis alterna, y al principio son muy pegajosas, lo mismo que las ramillas.

El aliso es una especie monoica; las flores masculinas, constituidas por 4 sépalos y 4 estambres, están agrupadas en inflorescencias amentaceas (racimo de cimas en dicasio), con tres flores por bráctea. Estas inflorescencias miden entre 5 y 12 cm de largo, siendo primero erectas y de maduras péndulas. Las flores femeninas están constituidas por un gineceo súpero sincárpico de 2 carpelos rematados por un estilo y dos estigmas rojizos; se agrupan en inflorescencias semejantes a las de las flores masculinas de aspecto ovoide, que cuando maduran quedan leñosas y enegrecidas.

La fenología es variable, pero suele florecer de febrero a abril y maduran los frutos a final del otoño, manteniéndose mucho tiempo en el árbol.

Su área de distribución es relativamente amplia (Europa, Asia y NW de Africa). Forma bosques en galería en ríos y riberas, fondos de valle, lugares inundados y laderas húmedas, hasta los 1700 m.

#### 1.4. Plan de trabajo: objetivos.

Las modificaciones de distintas características edáficas (físicoquímicas y microbiológicas) que se dan en torno a plantas diazotrofas han sido objeto de distintos estudios previos (Gutiérrez Mañero, 1987; Llinares, 1990; Probanza, 1991 y Pozuelo, 1991; Acero, 1993). La mayor parte de estos estudios se han centrado en los efectos de la planta sobre el suelo circundante a diferentes distancias y profundidades de la misma, estudiando los microorganismos de los grupos funcionales del ciclo del nitrógeno. El presente trabajo aborda los efectos del Aliso sobre su rizosfera a través de los exudados y el camino inverso: los efectos de los microorganismos rizosféricos sobre la planta. En el estudio de estos efectos se han considerado de un modo especial las derivaciones que afectan al ciclo del nitrógeno. Por todo ello el trabajo está estructurado en dos partes diferenciadas:

##### (i) dirección planta suelo:

1. Estudio de la composición de los exudados nodulares y radicales de Alnus glutinosa en condiciones de estrés hídrico. Los nódulos y raíces necrosan, y por procesos de autólisis liberan sustancias de distinta naturaleza química.

2. Estudio de la composición de los exudados de alisos nodulados y sin nodular (en condiciones normales) de cultivos hidropónicos.

3. En ambos casos los exudados podrían estar implicados en la modificación de las actividades de los grupos funcionales del ciclo del nitrógeno, por contener compuestos que inhiban o activen los sistemas enzimáticos de las entidades taxonómicas que forman dichos grupos funcionales. Para comprobar esta hipótesis, se realizaron ensayos biológicos en los que se prueba el efecto de exudados sobre cuatro suelos distintos, estudiándose para la fijación de nitrógeno (ARA), amonificación, nitrificación, desnitrificación y producción de CO<sub>2</sub>.

La comprobación de la hipótesis incluye también la caracterización de los suelos (nitrógeno total, contenido en carbono orgánico, nitrógeno-nitrato, nitrógeno-amonio, textura, pH, CRM, ARA, amonificación, nitrificación y desnitrificación) y de los exudados, tanto físicoquímica (pH, nitrógeno-nitrato, nitrógeno-amonio, nitrógeno total y carbono orgánico) como bioquímica (azúcares, lípidos, aminoácidos y proteínas).

**(ii) dirección suelo-planta:**

1. Estudio de las bacterias asociadas a la rizosfera de Alnus glutinosa: variación estacional de la composición taxonómica a nivel de género y grupos fisiológicos del ciclo del nitrógeno a los que pertenecen los géneros mayoritarios de cada estación.

2. Efecto de los metabolitos producidos por las bacterias mayoritarias sobre la velocidad y tasa de germinación.

3. Efecto de los metabolitos producidos por las bacterias mayoritarias sobre el crecimiento de los alisos. Efectos sobre plantas noduladas y sin nodular (ARA, nitrógeno total, número de lóbulos, respiración nodular y distintos parámetros biométricos de la parte aérea y radical de las plantas).

## **2. MATERIALES Y METODOS EMPLEADOS EN LAS EXPERIENCIAS REALIZADAS EN EL SENTIDO PLANTA-SUELO**

## 2.1. Características de las zonas de muestreo

Los suelos empleados en las pruebas biológicas del presente estudio fueron recogidos en las tres grandes unidades fisiográficas de la provincia de Madrid: la sierra (suelo B), la rampa (suelo A) y la cuenca (suelo C); así mismo se empleó un suelo de aliseda (suelo D). Del estudio de los parámetros fisicoquímicos de dichos suelos se desprenden unas características muy distintas en los cuatro casos.

El suelo A se recogió en las proximidades de la urbanización Montepríncipe, en Boadilla del Monte. La vegetación de esta zona se encuadra dentro de la serie meso-supramediterránea guadarrámico-ibérica silicícola de la encina (Junipero oxicedri-Querceto rotunifoliae), en su facies matritense sobre sustratos detríticos (Rivas-Martínez, 1982). En el lugar donde se verificó el muestreo abundaban, además de la fagacea, Cistus ladanifer L., Retama sphaerocarpa (L.) Boiss., Helichrisum stoechas (L.) DC.

Se trata de un suelo con pH 7.30, con capacidad de campo de 1:1.6 (g:ml) y una textura franco arenosa (65 % de arenas, 13 % de arcillas y 21 % de limos). Siguiendo la Soil Taxonomy el suelo es por sus variaciones térmicas de tipo Mesic, según la humedad se encuadra en el tipo xérico y por el estado de evolución es un Inceptisol o anfisol.

La zona es de origen Miocénico (período medio) y está constituida por arcosas, arcillas arenosas y limos. Climatológicamente se caracteriza por su carácter sub-húmedo, con unas precipitaciones medias anuales de 400 a 600 mm y una temperatura media entre 10° y 12°C.

El suelo B, de la sierra, se recogió en Los Altos de Peguerinos. La vegetación corresponde a la subasociación Junipero nanae-Cytisetum purgantis pinetosum (Rivas-Martínez, 1982), con poca presencia de enebro rastrero y pequeñas manchas de pasto con nardeta (Nardus stricta L.) y Narcissus bulbocodium L.

Este suelo posee un pH de 4.30, una capacidad de campo de 1:2.8 (g:ml) y una textura Arcillo-arenosa (23 % de arenas, 52 % de arcillas y 23 % de limos). La Soil Taxonomy encuadra este suelo, según las variaciones térmicas a las que

esta sujeto, en el tipo Mesic, por su humedad en el tipo Ustico y por su estado de evolución tipo Entisol.

La zona, de origen Precámbrico-Cámbrico, formada principalmente por gneises glandulares fémmicos, y climatológicamente húmeda o sub-húmeda. Las precipitaciones anuales están en torno a los 800, 900 o hasta 1300 mm, en tanto que las temperaturas medias anuales son de 6° a 10°C.

El suelo C, de la depresión, se tomó de las lomas próximas a Ontígola, en las cercanías de la Nacional IV. La vegetación potencial del lugar corresponde a la serie mesomediterránea basófila de la encina: Bupleuro rigidi-Quercetum rotudifoliae, en su faciación sobre sustratos yesíferos. La vegetación real está constituida por algunos terófitos aromáticos (Thymus zygis) gramíneas amacoyadas (Stipa tenacissima) y otras especies de marcado carácter gipsófilo (Mercurialis annua, Gypsophila strthium).

Dicho suelo tiene un pH de 8.01, una capacidad de campo de 1:0.7 (g:ml) y una textura franco arenosa (52 % de arenas, 18 % de arcillas y 28 % de limos). Por las características ambientales y según la Soil Taxonomy el suelo es térmico, xérico y por su estado de evolución pertenece al grupo de los Aridisols.

El origen geológico de esta zona está en el Mioceno medio y está constituida por yesos tableados, arcillas y margas yesíferas. La climatología del lugar se caracteriza por la escasez de las precipitaciones (de 400 a 500 mm anuales) y una temperatura media anual de 13° ó 14°C.

El suelo D, de aliseda, se tomó del arroyo de las Tórtolas (véase apartado 2.2). Dicho suelo tiene un pH de 7.13, una capacidad de campo de 5:4.5 (g:ml) y una textura arcillo arenosa (24 % de arenas, 24 % de arcillas y 52 % de limos). Por las características ambientales y según la Soil Taxonomy el suelo es térmico, Udico y por su estado de evolución está en el grupo de los Entisols.

Geológicamente la zona está constituida por arenas, cantos y arcillas sobre rocas Precámbricas-Cámbricas de tipo granítico. La climatología del lugar se caracteriza por unas precipitaciones de 600 a 1000 mm anuales y una temperatura media anual de 9° a 12°C.

## 2.2. Zonas de recogida de nódulos y raíces

Los nódulos y raíces se recogieron en una aliseda próxima a los Toros de Guisando, coordenadas UTM 30TUK778691. La aliseda esta situada en los márgenes de un arroyo con acusado estiage, el cauce, en el que aparecen dispersos los alisos, varía entre una anchura de 5 y 3 metros. Las muestras de raíces y nódulos se obtuvieron de distintos pies de planta, como se reseña en el apartado 2.4, en una zona delimitada río abajo por una chopera y río arriba, a 77 metros, por un aclaramiento de los alisos.

La formación vegetal de la zona de muestreo pertenece a la serie Gallio broteriani-Alneto glutinosae, que climáticamente es una formación nemorosa, silvática, riparia e higrofitica dominada por el aliso. En esta aliseda aparecen algunas plantas como zarzales (Rubus ulmifolius), junto a otras especies como Scrophularia scorodonia L., Chelidonium majus L., Datura stramonium L., Arum maculatum L., Solanum dulcamara L. o Sambucus nigra L.

Los márgenes del arroyo están ocupados por formaciones de la serie Junipero oxicedri-Querceto rotundifoliae, bastante aclarada por su uso ganadero y salpicado de rosales silvestres y cornicabras (Pistacia terebrinthus L.).

Las semillas empleadas en las experiencias descritas en este apartado se recolectaron en la aliseda arriba mencionada y en las alisedas del río Sorbe a su paso por Humanes (Guadalajara) y del río Ugalde en Murguía (Alava).

## 2.3. Recogida y preparación de muestras de suelo

El muestreo en los 3 suelos se realizó en el otoño de 1990. En cada suelo se analizaron 3 réplicas formadas cada una de ellas por el homogeneizado de 3 fracciones de suelo tomadas al azar. En condiciones asépticas, con una azada previamente flameada se retiró la fôrna. Seguidamente se recogieron las porciones de suelo en cada punto seleccionado, se introdujeron en bolsas de plástico nuevas y se trasladaron al laboratorio.

Las muestras se tamizaron a través de mallas de 2.0 mm, separándose las fracciones destinadas a los análisis fisicoquímicos y las destinadas al análisis de las actividades de los grupos funcionales. Las primeras fueron secadas a

55°C para evitar pérdidas significativas de nitrógeno inorgánico. Las segundas se conservaron en recipientes a 4°C.

#### **2.4. Recogida y preparación de los nódulos y raíces**

La recogida de nódulos y raíces de Alnus glutinosa se hizo en árboles de distinta edad y situación en el soto de un modo aleatorio. Los nódulos y raíces de distinto tamaño y procedencia se guardaron en bolsas de plástico nuevas, despreciándose aquellos que presentaban signos de necrosis. Para retardar el inicio del proceso necrótico los nódulos fueron trasladados al laboratorio a 4°C y sin desprenderlos de las raíces.

#### **2.5. Obtención de los exudados**

##### **2.5.1. Obtención de exudados nodulares y radicales**

La obtención de exudados nodulares y radicales se realizó parcialmente según los métodos de Ayers y Thornthorn (1968). Un esquema del método se ilustra en la figura 2.1.

Una vez en el laboratorio, se lavaron raíces y nódulos con agua destilada y se dispusieron tres lotes de 100, 50 y 20 g (peso fresco). Seguidamente, fueron esterilizados con hipoclorito para que los microorganismos rizoplánicos no actuasen sobre los exudados. Posteriormente se retiró el hipoclorito mediante tres lavados sucesivos con agua estéril. Los nódulos y raíces fueron secados en condiciones asépticas en una campana de flujo laminar durante 7 días. De esta manera se provoca la necrosis por estrés hídrico y por falta de aporte de nutrientes y fotosintatos.

Transcurridos 7 días, los lotes de nódulos y raíces, fueron introducidos en tres vasos de precipitado que contenían cada uno un litro de agua destilada estéril y se tuvieron en maceración durante 12 horas. En este período la campana de flujo laminar era encendida cada 3 horas para extraer humedad y evitar contaminaciones. Así mismo cada 6 horas se encendía la lámpara de luz ultravioleta durante 10 minutos. El sobrenadante se filtró en condiciones estériles, obteniéndose de esta manera las soluciones de exudados nodulares y radicales en cada caso, en tres concentraciones: 10%, 5% y 2%.



El líquido resultante de cada maceración se distribuyó, en condiciones estériles, en tubos de ensayo y se congeló a  $-20^{\circ}\text{C}$ , para poder emplear la cantidad necesaria en cada experiencia.

#### 2.5.2. Obtención de exudados de plantas noduladas y sin nodular

La obtención de los exudados de plantas noduladas y sin nodular se basa parcialmente en los métodos de Svenningsson et al. (1990). Un esquema del método se ilustra en la figura 2.2.

Las semillas se esterilizaron superficialmente con hipoclorito sódico (10 g/l), durante 20 minutos, lavándose posteriormente cuatro veces con agua destilada y estéril. Estas se sembraron en ocho bandejas de plástico de 50 x 30 x 5 cm, lavadas previamente con alcohol de 96% y agua destilada y estéril, que contenían vermiculita Termita nº3, estéril. Se regaron con solución Crone con nitrógeno (véase apéndice A, tabla A.I.1), estéril, diluida a 1/4 y ajustada a pH 5 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N. Efectuada la siembra se taparon la bandejas con plástico perforado "Glad" para favorecer las condiciones óptimas de humedad. Se mantuvieron en una cámara de germinación a  $21^{\circ}\text{C}$  con un fotoperiodo de 10 h de luz, regándose diariamente a peso constante con la misma solución estéril.

Transcurridas cuatro semanas desde el inicio de la germinación, cuando las plantulas tenían 2 ó 3 hojas bien desarrolladas se procedió a la nodulación regando cuatro de las ocho bandejas con un macerado de nódulos de aliso. Los nódulos empleados para el macerado se esterilizaron superficialmente con hipoclorito sódico (40 g/l) durante 20 minutos y se lavaron cinco veces con agua destilada y estéril. El macerado de nódulos se preparó machacando estos con un mortero de vidrio en condiciones asépticas. Las plantas noduladas se regaron desde cuatro días antes de la nodulación con Crone sin nitrógeno.

Se dejaron crecer las plantas hasta que tenían 8 pares de hojas, eliminándose (tanto en las noduladas como en las no noduladas) las que mostraban signos de necrosis foliar, en ese momento se pasaron a cultivo hidropónico. A fin de eliminar contaminación rizosférica se esterilizaron los aparatos radicales con hipoclorito sódico (10 g/l) durante 3 minutos lavándose 7 veces con abundante agua a pH 4 y estéril. El medio consistió en solución nutritiva Crone sin nitrógeno en las plantas noduladas y Crone con nitrógeno en las plantas sin nodular, en todos los casos a pH 5 y a 1/2 de su

concentración. Los recipientes empleados para el cultivo hidropónico fueron Erlenmeyer de 250 ml tapados con papel de aluminio, sujetándose la planta al cuello del recipiente mediante una hila de algodón hidrófobo.

Las plantas se mantuvieron en cultivo hidropónico una semana, transcurrida la cual se eliminaron las plantas que mostraban signos de necrosis. El resto se pasaron a un nuevo cultivo hidropónico igual al descrito anteriormente donde se mantuvieron por espacio de dos semanas. Transcurrido este período de tiempo se almacenaron los medios de crecimiento en los cuales se encuentran los exudados. Se diluyeron con el propio medio de cultivo a la mitad y a un cuarto, obteniéndose en cada caso (noduladas y sin nodular) tres soluciones, al 100%, 50% y 25%. A continuación se almacenaron en lotes de 50 ml a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

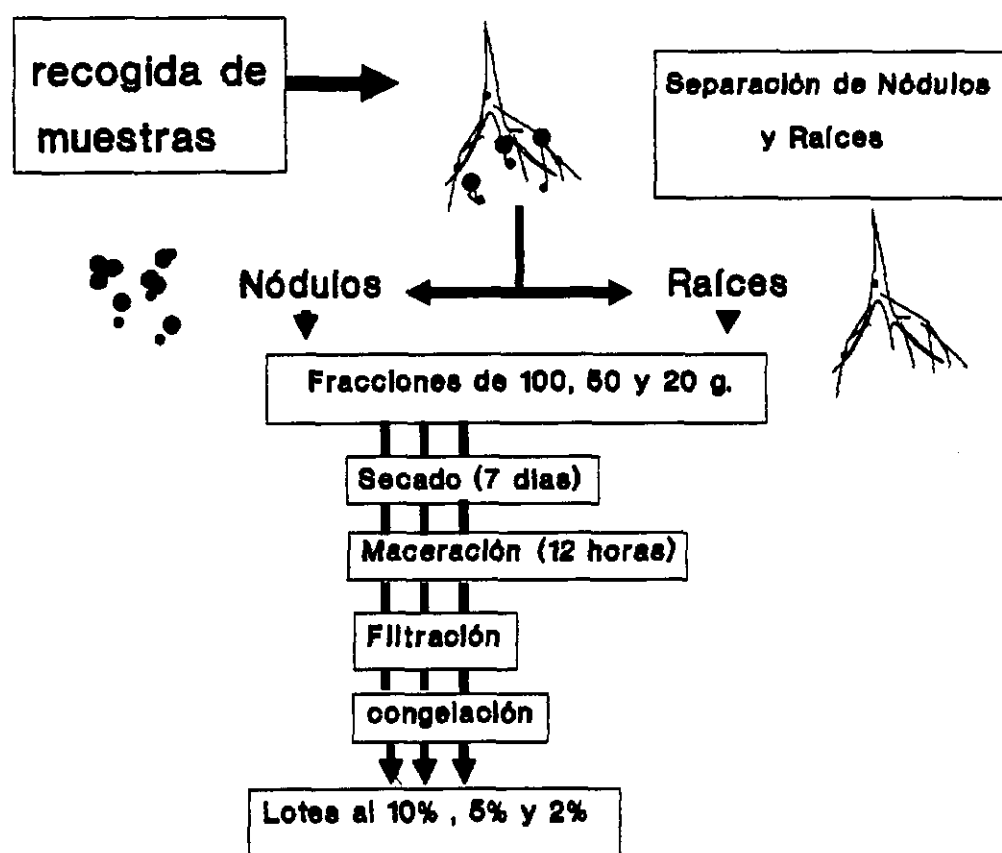


Figura 2.1. Protocolo de obtención de los exudados nodulares y radicales.

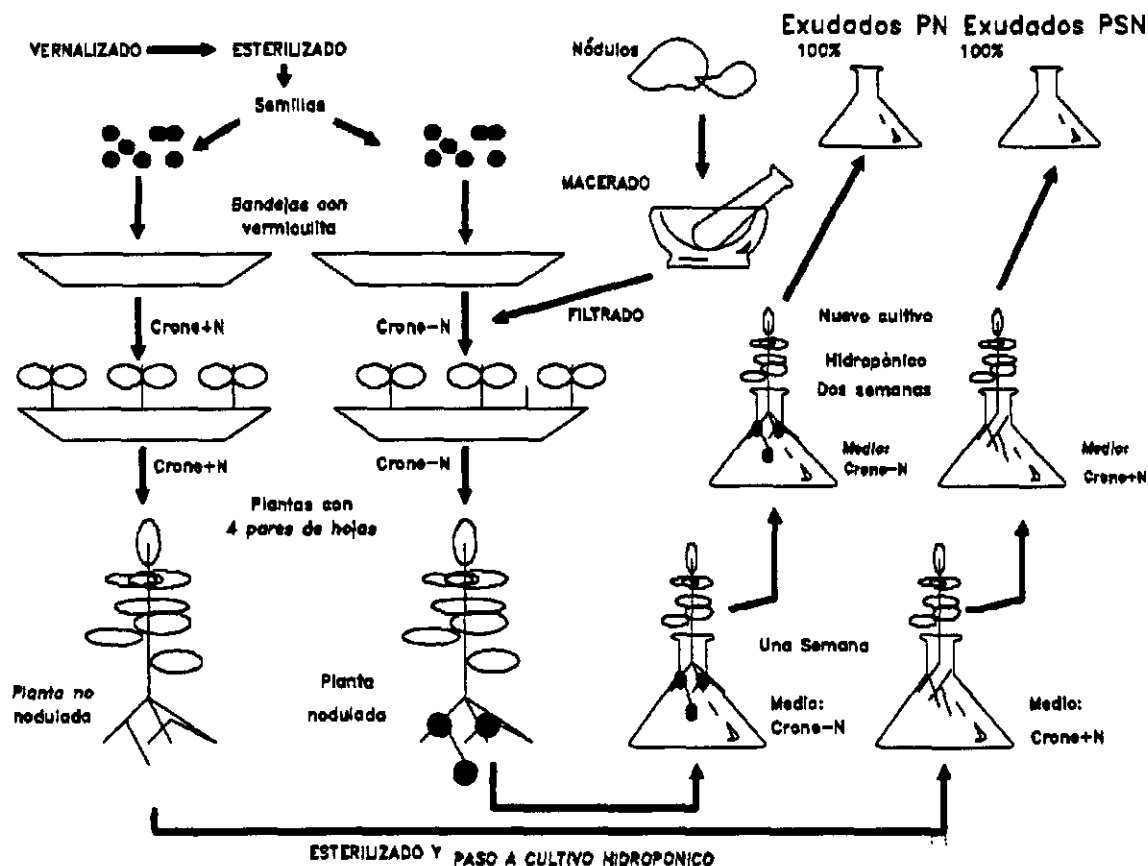


Figura 2.2. Protocolo de obtención de exudados de plantas noduladas y plantas sin nodular.

## 2.6. Caracterización de suelos y exudados

Tanto las muestras de suelo como los exudados (nodulares, radicales, de plantas noduladas y de plantas sin nodular) se sometieron a análisis fisicoquímicos para caracterizarlos. A continuación pasamos a describir la metodología empleada en cada caso.

### 2.6.1. Análisis fisicoquímico en suelos

En los métodos que se describen a continuación se emplearon fracciones de suelo separadas a tal efecto (véanse apartados 2.1 y 2.3.).

#### 2.6.1.a. Capacidad de retención máxima (CRM)

Se determinó por el método de García Trejo (1981). Las muestras de suelo fueron secadas a 110 °C durante 24 h. Posteriormente se dispusieron 5 g de tierra sobre algodón hidrófobo en un embudo. A continuación se fue goteando agua mediante una bureta sobre el montaje antes descrito, hasta que cayó del

embudo la primera gota. El volumen de agua empleado es la CRM expresado en ml/g.

#### 2.6.1.b. Textura de las suelos

La textura de cada suelo se determinó por el método de Bouyucos. Este método se basa en la dispersión de las partículas en un medio líquido, utilizando una solución acuosa de metafosfato sódico y carbonato sódico en cantidad suficiente para obtener una concentración 0.5 N de sodio. Previamente la muestra fue tratada con peróxido de hidrógeno para eliminar la materia orgánica, filtrada y lavada con agua. Mediante el densímetro de Bouyucos se comprueba la densidad de la suspensión a tiempos determinados y aplicando la ecuación de Stokes se obtiene el diámetro de las partículas sedimentadas (Day, 1965).

#### 2.6.1.c. Medida del pH

Se realizó frente a agua destilada. Se mezclaron 20 g de tierra y 20 ml de agua destilada, agitándose la mezcla durante 20 minutos. Después se midió con un peachímetro Beckman  $\Phi$  12 P/N 123134 provisto de un electrodo combinado de vidrio modelo Radiometer GK 2401 C.

#### 2.6.1.d. Determinación del nitrógeno total

Las muestras de suelo se sometieron a digestión según el método de Kjeldhal (1883) y posteriormente se valoró el amonio producido, mediante electrodo selectivo. A continuación se describe el método detalladamente.

Las muestras de suelo se secaron a 55°C hasta peso constante en las tres primeras cifras decimales. A 2 g de la muestra se le añadieron 25 ml de  $H_2SO_4$  concentrado y 10 g de catalizador ( $K_2SO_4$  y  $CuSO_4$ , 15:0.5). La mezcla se mantuvo a 500°C durante 1 hora para que el ácido oxidara los distintos componentes y todo el nitrógeno pasara a  $(NH_4)_2SO_4$ . Una vez frío se extrajo 1 ml del líquido digerido y se diluyó en 45 ml de agua destilada. Se añadieron 5 ml de NaOH 10 M y se agitó para facilitar la sustitución del amonio. El amonio liberado se determinó por un electrodo específico, modelo ORION 95-10-00 conectado a un mv/pHmetro CRISON digit 501.

Los datos obtenidos se llevaron a una recta patrón con el fin de ser transformados en unidades de nitrógeno total. Esta recta se trazó a partir de diluciones sucesivas de una estándar de 100 ppm de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Los valores correspondientes se ajustaron a una recta por el método de los mínimos cuadrados.

#### 2.6.1.e. Determinación del nitrógeno amonio

Se partió de 5 g de suelo a los que se añadieron 45 ml de agua destilada y 5 ml de NaOH 10 M. La mezcla se agitó y el amonio liberado se determinó con el mismo electrodo y mv/pHmetro descritos anteriormente.

Los datos obtenidos se llevaron a una recta patrón a partir de diluciones sucesivas de una solución estándar de 100 ppm de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  como fuente de amonio. Los valores correspondientes se ajustaron a una recta por el método de los mínimos cuadrados.

#### 2.6.1.f. Determinación del nitrógeno nitrato

Se siguió el método de Milham *et al.* (1970). Se tomaron 4 g de suelo y se disolvieron en 20 ml de una solución extractora del ión nitrato (véase apéndice A, Tabla A.I.2). Mediante agitación vigorosa durante 20 minutos se logra que los nitratos de la muestra difundan al medio acuoso. la solución se deja sedimentar y se procede a medir la concentración de nitrato.

Como en los casos anteriores se empleó un mv/pHmetro CRISON digit 501, provisto de un electrodo específico de nitrato ORION 93-07-00 y un electrodo de referencia ORION 90-02-00.

A partir de diluciones sucesivas de una estándar de 200 ppm de  $\text{KNO}_3$  en solución extractora, se realizó la recta patrón. Los valores obtenidos se ajustaron por el método de los mínimos cuadrados.

#### 2.6.1.g. Determinación de carbono orgánico

Se empleó el método de Walkley y Black (1934) modificado. Se basa en la oxidación del material del suelo fácilmente oxidable con dicromato potásico. La muestra de suelo se trató con exceso de oxidante y la proporción gastada de este se determinó valorando por retroceso con una solución valorada de sal ferrosa.

A 1 g de suelo secado a 55 °C hasta pesada constante en las tres primeras cifras decimales, se le añadieron 15 ml de  $K_2Cr_2O_7$  1 N y 20 ml de  $H_2SO_4$  concentrado agitando la mezcla un minuto y dejándola reposar durante treinta. A continuación se diluyó con 200 ml de agua destilada, con el objeto de facilitar la observación del punto final de la titulación. Se añadieron 25 ml de  $H_3PO_4$  al 50% (v/v) para hacer más patente el viraje y 20 gotas de difenilamina sulfúrica como indicador. Se valoró con  $FeSO_4$  0.5 N por retroceso. Simultáneamente se realizó todo el proceso con un control sin suelo, para valorar los productos oxidantes de los reactivos.

En la obtención del porcentaje de carbono orgánico de la muestra de suelo se consideró que 1 ml de  $K_2Cr_2O_7$  es equivalente a 0.003 g de carbono, y que el método es efectivo en un 75% por lo cual el factor de corrección al 100% es 1.33 (García-Trejo, 1981).

#### 2.6.2. Análisis fisicoquímico de los exudados

Las soluciones de exudados obtenidos según los apartados 2.5.1. y 2.5.2. se caracterizaron estudiándose las variables más interesantes de cara al presente trabajo.

El pH se midió directamente en el extracto de exudados en las mismas condiciones en que se determinó en las fracciones de suelo.

La medición de nitrógeno total se hizo conforme se señala en el apartado 2.6.1.d. El volumen de solución de exudados empleado fue 1 de ml.

El nitrógeno amonio se determinó del mismo modo al referido en el apartado 2.6.1.e. El volumen de solución de exudados empleado fue de 5 ml.

El nitrógeno nitrato como se señaló en el apartado 2.6.1.f. El volumen de solución de exudados empleado fue de 4 ml.

Finalmente la medición de *carbono orgánico* se hizo según el protocolo descrito en el apartado 2.6.1.g. El volumen de solución de exudados empleado fue de 1 ml.

#### 2.6.3. Caracterización Bioquímica de los exudados

En la caracterización bioquímica de exudados nos hemos centrado en los principios inmediatos que, según la bibliografía, de una forma general presentan un efecto apreciable sobre el desarrollo y la actividad de los microorganismos rizosféricos.

#### 2.6.3.1. Proteínas

El análisis cuantitativo de las proteínas se realizó siguiendo los métodos de Biuret y de Lowry (Gormale *et al.*, 1949; Lowry *et al.* 1951). Se emplearon dos métodos en previsión de las posibles interferencias que pueden darse entre los polifenoles existentes en los exudados y el reactivo de Folin.

En ambos casos, la concentración de proteínas se efectuó mediante rotavapor a una temperatura de 35°C partiendo de 15 ml de exudados de cada uno de los cuatro tipos en su forma más concentrada. Una vez evaporada el agua, se diluyó el precipitado en 2 ml de agua destilada, haciéndose un banco de diluciones de 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/32, y 1/128 con los cuatro tipos de exudados.

En ambos métodos se hace una valoración colorimétrica de proteínas para lo cual se construyó una recta patrón en cada caso.

**Biuret:** La recta se construyó a partir de 10 tubos de ensayo que contenían 10 ml de seroalbúmina en concentraciones desde 0 mg/ml hasta 1mg/ml. A cada tubo se le añadieron 5 ml de NaOH 0.1 N y Tartrato Na-K al 20% (p/v) en proporción 0.5:25. Tras 15 minutos de reposo se leyó la absorbancia a 500 nm en un colorímetro Spectronic 20D (Roy Milton Company). Con los problemas (exudados nodulares, radicales, de plantas noduladas y de plantas sin nodular) se efectuó idéntico proceso, interpolándose los distintos valores en la recta patrón construida a tal efecto.

**Lowry:** El protocolo es esencialmente el mismo, a excepción de que además se añaden 0.5 ml del reactivo de Folin-Ciocalteu (Panreac) 1/3 diluido, midiéndose también la absorbancia a 500 nm.

#### 2.6.3.2. Hidratos de carbono

Los hidratos de carbono se valoraron cualitativamente, mediante cromatografía en capa fina, siguiendo el método de Clark (1983). Los cuatro tipos de exudados, se concentraron en rotavapor a partir de 20 ml. Los concentrados se aplicaron en cromatofolio aluminado de celulosa F de 20 x 20 cm

(Merck), aplicándose también estándares de fructosa, galactosa, glucosa, lactosa, maltosa, xilosa, rafinosa, manosa, sacarosa, sorbosa, rhamnosa, levulosa y sorbitol al 1% (p/v) en agua.

La cromatografía se corrió en una cubeta de vidrio, empleándose como fase móvil isopropanol: ácido acético: agua (3:1:1). El revelado se efectuó rociando la cromatografía con reactivo de anilina-ácido oxálico. Dicho reactivo está formado por una disolución de anilina en agua destilada al 2% que se añade con ácido oxálico 0.25% (p/v), en proporción 2:3, antes de rociar. El revelado se completa manteniendo el papel de cromatografía en estufa a 110°C durante 15 minutos.

### 2.6.3.3. Lípidos

La caracterización de lípidos se efectuó cualitativa y semicuantitativamente, siguiendo el método de Bligh y Dyer (1959). A 2 ml de cada tipo de exudados se añadieron 2 ml de cloroformo y 5 de metanol agitándose la mezcla durante 2 minutos. Seguidamente se añadieron otros 2 ml de cloroformo y tras agitar 2 minutos se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos en una centrífuga de mesa Selecta S-240. Efectuada la centrifugación, se guardó la fase orgánica repitiéndose el proceso para la fase acuosa dos veces. Las tres fases orgánicas se juntaron tratándose con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro para eliminar el agua. Seguidamente se filtró a un tubo de peso conocido, evaporándose el cloroformo mediante rotavapor a 35°C. Una vez eliminado el cloroformo se calculó la cantidad de lípidos por diferencia.

El análisis cualitativo se realizó en cada tipo de exudados mediante cromatografía en capa fina en gel de sílice. Los lípidos obtenidos como se describió en el párrafo precedente, se redisolviéron en 0.1 ml de cloroformo y se aplicaron en una hoja de cromatografía (20 x 20 cm, Merck), junto a tres patrones: lecitina, coleserol y tripalmitina al 10% en cloroformo. La cromatografía se corrió en una cubeta de cristal, usando como fase móvil hexano: acetona: ácido acético (70:30:2). Para el revelado, se roció la cromatografía con ácido fosfomolibdico al 10% en destilada y se mantuvo en estufa 10 minutos a 80°C.



## **2.7. Análisis de la actividad de los grupos funcionales del ciclo del nitrógeno en presencia de exudados**

Se determinaron: la actividad reductora del acetileno potencial (ARA), el potencial amonificante (mineralización), el potencial nitrificante y el potencial desnitrificante total. La valoración de estas actividades se realizó aplicando los exudados obtenidos según se ha descrito en 2.5. sobre los suelos recogidos en las zonas descritas en 2.1.

### **2.7.1. Determinación de la actividad reductora de acetileno (ARA) potencial en los suelos en presencia de exudados**

La actividad reductora de acetileno en suelos se evaluó siguiendo el método de McNabb y Geist (1979) en las condiciones que proponen Grant y Binkley (1987). Para ello se colocaron 50 g de los cuatro suelos en recipientes estancos de 375 ml. A continuación se añadieron los exudados nodulares al 10%; la operación se repitió para las concentraciones al 5% y 2%, y siguiendo el mismo método para los exudados radicales obtenidos en ambos casos como se indica en 2.5.1. Respectivamente los tratamientos se denominaron T1N y T1R, cuando se aplican los exudados al 10%, T2N y T2R al 5% y T3N y T3R al 2%, indicando la letra N o R si los exudados son de origen nodular o radical (Esta nomenclatura se sigue en todo el apartado 2.7 y capítulo 4). En todos los casos se llevaron a CRM. Además se hicieron seis controles:

El primero (común para nodulares y radicales) con agua destilada estéril a CRM (Ca).

El segundo adicionando el máximo aporte de carbono que proporcionan los exudados en forma de glucosa (2.66%, en nodulares y 2.053% en radicales) y agua destilada estéril a CRM (Co).

El tercer control, fue análogo al segundo pero con doble concentración de glucosa, es decir un 5.32 % en nodulares y 4.106% en radicales ,(2C).

En el cuarto control se adicionó la misma cantidad de glucosa que en el segundo control y se llevó a CRM con los exudados en su máxima concentración es decir al 10% (C+E).

En el quinto control se adicionó la misma cantidad de glucosa que en Co y se llevó a CRM con una disolución de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  de 2.5 g/l, (M+C).

El sexto control con una disolución de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  de 2.5 g/l a CRM, M.

En el caso de los ensayos con exudados de plantas noduladas y sin nodular se procedió de modo análogo al descrito anteriormente, es decir también se aplicaron los exudados, en este caso obtenidos según el apartado 2.5.2, al 100%, 50% y 25%, respectivamente tratamientos T1, T2, y T3PN cuando los exudados procedían de plantas noduladas y T1, T2 Y T3PSN cuando procedían de plantas sin nodular. En los controles se introdujeron las siguientes modificaciones: Los controles Co llevaron en ese caso un 4.01% de glucosa en exudados de plantas noduladas y 2.36% en los de plantas sin nodular; los controles 2C se efectuaron con 8.02 % en el caso de exudados de plantas noduladas y 4.72% en los de plantas sin nodular. Además se efectuaron otros dos controles comunes para ambos tipos de exudados: el primero con Crone con nitrógeno, a CRM (CN) y el segundo con Crone sin nitrógeno, también a CRM (SN), ya que los exudados se colectaron en el medio nutritivo Crone en el que crecieron las plantas.

Posteriormente se sustituyó un 10% de la atmósfera de los recipientes por acetileno y se dejaron en incubación durante 24 horas a temperatura ambiente. Al mismo tiempo se realizaron incubaciones sin acetileno en los cuatro suelos para estimar la emisión de etileno procedente de otras fuentes que no fuera la reducción del acetileno.

El etileno producido tras una hora de incubación se midió en un cromatógrafo de gases KONIC 3000 HRGC, con un detector de ionización de llama y una columna Porapak R (malla 80/100) de 150 cm de longitud y 0.3 cm de sección, en las condiciones siguientes:

Temperatura de la columna: 50 °C.

Temperatura del inyector: 100 °C.

Temperatura del detector: 150 °C.

Gas portador: Nitrógeno.

Flujo del gas portador: 20 ml/min.

Volumen de la muestra: 0.5 ml.

#### **2.7.2. Determinación del potencial amonificante en presencia de exudados**

Para evaluar la amonificación potencial se siguió el método de Standford y Smith (1972). En recipientes de 120 ml se incubaron: 15 g de cada suelo, 0.09 g de Asn, 0.15 ml de solución de oligoelementos, 3.75 ml de solución de

Winograsky doble concentrada y exudados nodulares o radicales (T1N y T1R; T2N y T2R; T3N y T3R) hasta la CRM. Se hicieron dos controles: el primero con 0.09 g de Asn y agua destilada estéril (Ca). El segundo control se hizo con 0.09 g de Asn adicionando el máximo aporte de nitrógeno mineralizable de los exudados (el que aporte cada la solución de exudados al 10%) en forma de N-Asn y las soluciones de oligoelementos (0.15 ml) y Winograsky (3.75 ml doble concentrada) junto con agua destilada estéril hasta CRM (CNN y CNR).

En el caso de los exudados de plantas noduladas y sin nodular, además de los distintos tratamientos (T1, T2 y T3 de PN y PSN) se efectuaron otros dos controles más con Crone con y sin nitrógeno análogos a los descritos en el epígrafe precedente.

Los recipientes se taparon con algodón para evitar contaminaciones y permitir la transpiración. Se incubaron 72 h en oscuridad a 21°C.

De todos los recipientes se tomaron 5 g de la mezcla al iniciarse la incubación y otros tantos finalizar la misma. En estas alícuotas se midió el amonio producido, obteniéndose  $N_t$ , del modo en que se reseña en el apartado 2.6.1.e. Posteriormente se calculó el potencial mineralizante por la ecuación de Stanford y Smith (1972):

$$\log (N_o - N_t) = \log N_o - kt,$$

donde "k" es dicho potencial o la tasa de mineralización,  $N_o$ , el N mineralizable a tiempo cero (Asn) y  $t$  72 h.

### 2.7.3. Determinación del potencial nitrificante en presencia de exudados

Para la determinación del potencial nitrificante se siguió el método de Adams y Attiwill (1982). Se incubaron 100 g de suelo y se introdujeron en recipientes de 500 ml. A cada suelo se agregaron las soluciones de exudados radicales y nodulares al 10%, 5% y 2% (T1N y T1R; T2N y T2R; T3N y T3R) a CRM y se suplementaron con 0.016 g de  $(NH_4)_2SO_4$ , cantidad suficiente para que la concentración de amonio sea superior a 10 ppm e inferior a 800 ppm. Por debajo de 10 ppm el amonio es limitante para la nitrificación (Verstrate, 1981) y por encima de 800 ppm se inhibe el proceso (Jones y Hedlin, 1970).

Además se hizo un control común para ambos con agua y 0.016 g  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (Ca) y otro con la citada cantidad  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , el aporte máximo de amonio de exudados y agua, siempre a CRM (CNN y CNR).

En el caso de los exudados de plantas noduladas y sin nodular, aparte de los diferentes tratamientos (T1, T2 y T3 de PN y PSN) se efectuaron controles con Crone con y sin nitrógeno como los descritos en los apartados precedentes. Los recipientes se taparon con algodón para evitar contaminaciones y permitir la transpiración.

Se tomó una muestra de suelo de cada recipiente al inicio de la incubación y se midió el contenido en nitrato. La incubación se verificó en oscuridad durante 20 días a 21 °C, transcurridos los cuales se procedió a medir el contenido en nitrato. Las mediciones de este se hicieron como se indica en el apartado 2.6.1.f. El incremento en nitrato en ppm durante dicho período es el potencial nitrificante. Durante la incubación se pesaron los recipientes cada 48 horas para reponer con agua destilada estéril las pérdidas de humedad.

#### **2.7.4. Determinación del potencial desnitrificante total en presencia de exudados**

Se efectuó por el método de inhibición por acetileno (Yoshinari y Knowles, 1976), en las condiciones descritas por Vinther (1984). Se tomaron 50 g de tierra a los que se adicionaron los exudados nodulares y radicales (T1N y T1R; T2N y T2R; T3N y T3R) hasta CRM y se introdujeron en recipientes estancos de 375 ml de volumen. A continuación se sustituyeron 37.5 ml de la atmósfera del recipiente por otros tantos de acetileno. En esta experiencia se hicieron controles iguales a los descritos en el apartado 2.7.1, a excepción de los que contenían molibdeno.

En el caso de los exudados de plantas noduladas y sin nodular, además de los diferentes tratamientos se efectuaron también controles con Crone con y sin nitrógeno.

Los suelos se incubaron durante 96 horas a 21°C. El óxido nitroso producido se evaluó por cromatografía de gases en un cromatógrafo KONIK 3000 HRGC, con un detector de conductividad térmica y una columna Cromosorb 101 (malla 80/100) de 200 cm de longitud y 0.2 cm de sección, en las siguientes

condiciones:

Temperatura de la columna: 45°C

Temperatura del inyector: 75°C

Temperatura del detector: 100°C

Gas portador: Helio

Flujo del gas Portador: 18 ml/min

Volumen de Muestra: 1 ml

#### **2.7.5. Producción de dióxido de carbono en presencia de exudados**

Para establecer la producción de CO<sub>2</sub> se empleó el mismo protocolo que en la desnitrificación, tanto en las condiciones de incubación como de cromatografía. La columna y condiciones empleadas permiten separar el CO<sub>2</sub> del resto de los gases y por lo tanto conocer la producción de CO<sub>2</sub> en nmoles g<sup>-1</sup> de suelo h<sup>-1</sup>.

#### **2.8. Tratamiento de la información**

En este estudio se ha trabajado con variables fisicoquímicas y bióticas. Aunque los métodos empleados son de uso bastante generalizado, están expuestos a posibles errores experimentales, si bien la eficiencia y limitaciones de dichos métodos están suficientemente probadas. Las mediciones en cada prueba (tanto fisicoquímicas como bióticas) se han hecho sin seguir orden en las réplicas, por lo que el error experimental es aleatorio. Así pues la distribución de una variable determinada y sus errores se pueden considerar como aleatorios, o al menos lo suficientemente parecidos para permitir el empleo de pruebas paramétricas en el contraste de las hipótesis formuladas.

Las fuentes de variación son la concentración de exudados (nódulares y radicales por una parte y los de plantas noduladas y sin nodular por otra), los respectivos controles y los cuatro suelos ensayados. Para la comparación de los datos bióticos se ha empleado el análisis de la varianza (ANOVA) bidireccional con réplicas y dos factores de variación (Sokoal y Rohlf, 1979): concentración de exudados y tipo de suelo. La actividad biológica de los distintos grupos funcionales se considera por separado. Por una parte en presencia de exudados nodulares y radicales y por otra en presencia de exudados de plantas noduladas y sin nodular. Esta separación responde a las diferencias existentes en el proceso de obtención de las dos grupos de exudados.

Cuando dichos factores influyen significativamente al nivel del 95% (\*) o del 99% (\*\*), se procede a la comparación de los valores medios mediante el test estadístico LSD (mínima diferencia significativa) (Sokoal y Rohlf, 1979).

Por otra parte se han comparado los datos fisicoquímicos de los suelos y de los exudados mediante análisis de la varianza unidireccional con réplicas, con el fin de estimar las diferencias en cada parámetro (pH, carbono orgánico, Nitrógeno total, N-amonio y N-nitrato) entre los cuatro suelos.

### 3. MATERIALES Y METODOS EMPLEADOS EN LAS EXPERIENCIAS REALIZADAS EN EL SENTIDO SUELO-PLANTA

### **3.1. Determinación de las bacterias rizosféricas de Alnus glutinosa.**

La selección de bacterias rizosféricas se realizó en una aliseda próxima a "Los Toros de Guisando", coordenadas UTM 30TUK778691. La aliseda está situada en los márgenes del arroyo "Las Tórtolas" y ya ha sido descrita en el apartado 2.1.

#### **3.1.1. Recogida y preparación de muestras de suelo**

Las muestras de suelo rizosférico se recogieron al principio y mediados de cada estación. En cada momento del muestreo se recogieron tres réplicas. Cada una de las réplicas está constituida por el suelo adherido a ocho raíces (de calibre comprendido entre 10 y 50 mm) recolectadas a una profundidad de 10 a 20 cm, de alisos seleccionados al azar. Las tres réplicas se corresponden con las tres zonas de muestreo, que son el resultado de dividir la aliseda en tres parcelas de superficie semejante.

Las muestras se recogieron en condiciones asépticas, con una azada previamente flameada se retiró la hojarasca. Seguidamente se recogieron las porciones de suelo en cada punto seleccionado, se introdujeron en bolsas de plástico estériles y se trasladaron al laboratorio a 4°C.

Las muestras se tamizaron a través de mallas de 2.0 mm, separándose las fracciones destinadas a los análisis fisicoquímicos y las destinadas a los análisis de las actividades microbiológicas. Las primeras fueron secadas a 55°C para evitar pérdidas significativas de nitrógeno inorgánico. Las segundas se conservaron en recipientes estériles a 4°C.

#### **3.1.2. Preparación de las suspensiones-diluciones de suelo y selección de las bacterias identificadas**

Se elaboró un banco de diluciones sucesivas partiendo de 10 g de suelo de cada una de las réplicas. Cada una de ellas corresponde a las tres zonas de muestreo en que se dividió la aliseda. La tierra se depositó en un mortero estéril y se trituró finamente. Se agregaron 20 ml de agua destilada estéril y se continuó triturando la muestra. Posteriormente se trasvasó a un erlenmeyer estéril, lavando varias veces el mortero con pequeñas fracciones de agua también estéril hasta completar en el erlenmeyer 100 ml. A partir de aquí se hicieron diluciones sucesivas hasta la  $10^{-9}$ .



De cada una de las tres réplicas se seleccionaron al azar 50 colonias de las placas en que se hallaron colonias aisladas ( $10^{-4}$  a  $10^{-9}$ ). Para la determinación de las colonias hasta el nivel de género se sembraron en agar B de King, agar McKonkey,  $D_1$  y  $D_3$  (Kado y Heskett, 1970), y se realizaron pruebas bioquímicas siguiendo el esquema diagnóstico de Acero et al. (1994).

```

graph TD
    Root[ ] --- Colonias[Colonias]
    Root --- Catalasa[Catalasa]
    
    Colonias --- Filamentosos[Filamentosos]
    Colonias --- Bacilos_o_cocos[Bacilos o cocos]
    
    Filamentosos --- XI[XI]
    
    Bacilos_o_cocos --- Resistencia_al_calor[Resistencia al calor]
    Resistencia_al_calor --- Si[Si]
    Resistencia_al_calor --- No[No]
    
    Si --- Catalasa2[Catalasa]
    Catalasa2 --- Minus["-"]
    Catalasa2 --- Plus["+"]
    Minus --- Cocos[Cocos]
    Plus --- Bacilos[Bacilos]
    Cocos --- Star1["*"]
    Bacilos --- I[I]
    
    No --- Gram[Gram]
    Gram --- Plus2["+"]
    Gram --- Minus2["-"]
    Plus2 --- Catalasa3[Catalasa]
    Minus2 --- Morfologia[Morfología]
    Catalasa3 --- Minus3["-"]
    Catalasa3 --- Plus4["+"]
    Minus3 --- Star2["*"]
    Plus4 --- Morfologia
    Morfologia --- Bacilos2[Bacilos]
    Morfologia --- Cocos2[Cocos]
    Bacilos2 --- II[II]
    Cocos2 --- III[III]
    
    Catalasa --- Pigmentacion[Pigmentación de colonias]
    Pigmentacion --- Transparente_y_blanca[Transparente y blanca]
    Pigmentacion --- Amarillo_rosa_o_naranja[Amarillo, rosa o naranja]
    
    Transparente_y_blanca --- Hugh_Lefson_test[Hugh & Lefson's test]
    Hugh_Lefson_test --- Oxidativo[Oxidativo]
    Hugh_Lefson_test --- Fermentativo[Fermentativo]
    Oxidativo --- Agar_D1[Agar D1]
    Agar_D1 --- Colonias_amarillas[Colonias amarillas]
    Colonias_amarillas --- XIII[XIII]
    Agar_D1 --- Colonias_azules[Colonias azules]
    Colonias_azules --- XII[XII]
    Fermentativo --- No_acido[No ácido]
    No_acido --- Kovacs[Kovacs]
    Kovacs --- Plus5["+"]
    Plus5 --- Movilidad[Movilidad]
    Movilidad --- Si3[Si]
    Si3 --- Agar_B_King[Agar B King]
    Agar_B_King --- V[V]
    Movilidad --- No3[No]
    No3 --- VI[VI]
    
    Amarillo_rosa_o_naranja --- Hugh_Lefson_test2[Hugh & Lefson's test]
    Hugh_Lefson_test2 --- Oxidativo2[Oxidativo]
    Hugh_Lefson_test2 --- Fermentativo2[Fermentativo]
    Oxidativo2 --- Kovacs2[Kovacs]
    Kovacs2 --- Plus6["+"]
    Plus6 --- Agar_B_King2[Agar B King]
    Agar_B_King2 --- IV2[IV]
    Oxidativo2 --- No_acido2[No ácido]
    No_acido2 --- IX[IX]
    Fermentativo2 --- Agar_Mc_Konckey[Agar Mc Konckey]
    Agar_Mc_Konckey --- Crecen_en_Agar_D2[Crece en Agar D2]
    Crecen_en_Agar_D2 --- Si4[Si]
    Si4 --- XIII2[XIII]
    Crecen_en_Agar_D2 --- No4[No]
    No4 --- X[X]
    
    Plus5 --- VIII[VIII]
    Plus6 --- VII[VII]
  
```

59

### 3.1.3. Identificación de bacterias pertenecientes a los géneros mayoritarios (Bacillus y Pseudomonas)

---

Con las bacterias mayoritarias de cada momento de muestreo (identificadas a nivel de género) se procedió a una identificación más exhaustiva. El objetivo no fue tanto una identificación específica sino un estudio de capacidades metabólicas muy concretas encaminado a separar grupos de especies.

Los dos géneros bacterianos estudiados fueron Bacillus y Pseudomonas. Para ello se procedió como sigue:

a) Pseudomonas: Para la formación de grupos subgenéricos de este género se empleo el Kit de identificación API 10-S (API SYSTEM S.A., Francia). Hay que destacar que este kit está diseñado para identificación de especies patológicas humanas. Sin embargo Alström (1987) utiliza este Kit para la tipificación de bacterias rizosféricas con buenos resultados. Los 10 tests de que consta el kit son:

ONPG:  $\beta$ -Galactosidasa                      GLU: Ferm./ox. de glucosa

ARA: Ferm./ox. de arabinosa    LDC: Lysina decarboxilasa

ODC: Ornitina descarboxilasa    CIT: Utilización del citrato

H<sub>2</sub>S: Producción de sulfhídrico    URE: Ureasa

TDA: Triptofano desaminasa    IND: Producción de Indol

OX: Citocromo oxidasa    NO<sub>2</sub>: Producción de dióxido de nitrógeno

Los tests TDA, IND, NO<sub>2</sub> y OX, requieren para su revelado reactivos específicos cuya composición se detalla en el apéndice A (A.II.2).

Del conjunto de reacciones se obtiene un índice numérico de 4 dígitos. Estos proceden de la suma de los valores positivos de los tests positivos de cada grupo de 3 tests, del siguiente modo:

ONPG	GLU	ARA	LDC	ODC	CIT	H <sub>2</sub> S	URE	TDA	IND	OX	NO <sub>2</sub>
1	2	4	1	2	4	1	2	4	1	2	4

La identificación se efectuó por la tabla de resultados del test que suministra el fabricante encontrándose tres grupos de cepas.

A: Código identificación Api 2422: P. putida, P. fluorescens o P. aeruginosa con un 91 % de probabilidad.

B: Código identificación Api 0406: Pseudomonas sp con un 90 % de probabilidad.

C: Código identificación Api 2422: Pseudomonas sp con un 80 % de probabilidad.

b) Bacillus: En el caso de este género la formación de grupos subgenéricos se efectuó a partir de 5 tests (todos ellos salvo el primero existen en el Kit Api-10):

CAT: Catalasa

GLU: Fermentación/oxidación de glucosa

CIT: Utilización de citrato

IND: Producción de Indol

ARA: Fermentación/oxidación de arabinosa

Con estos tests se diseñó un protocolo dicotómico para la formación de grupos basado en las características de diferentes especies de Bacillus recogidas por el manual Bergey. El protocolo se representa en la figura 3.2.

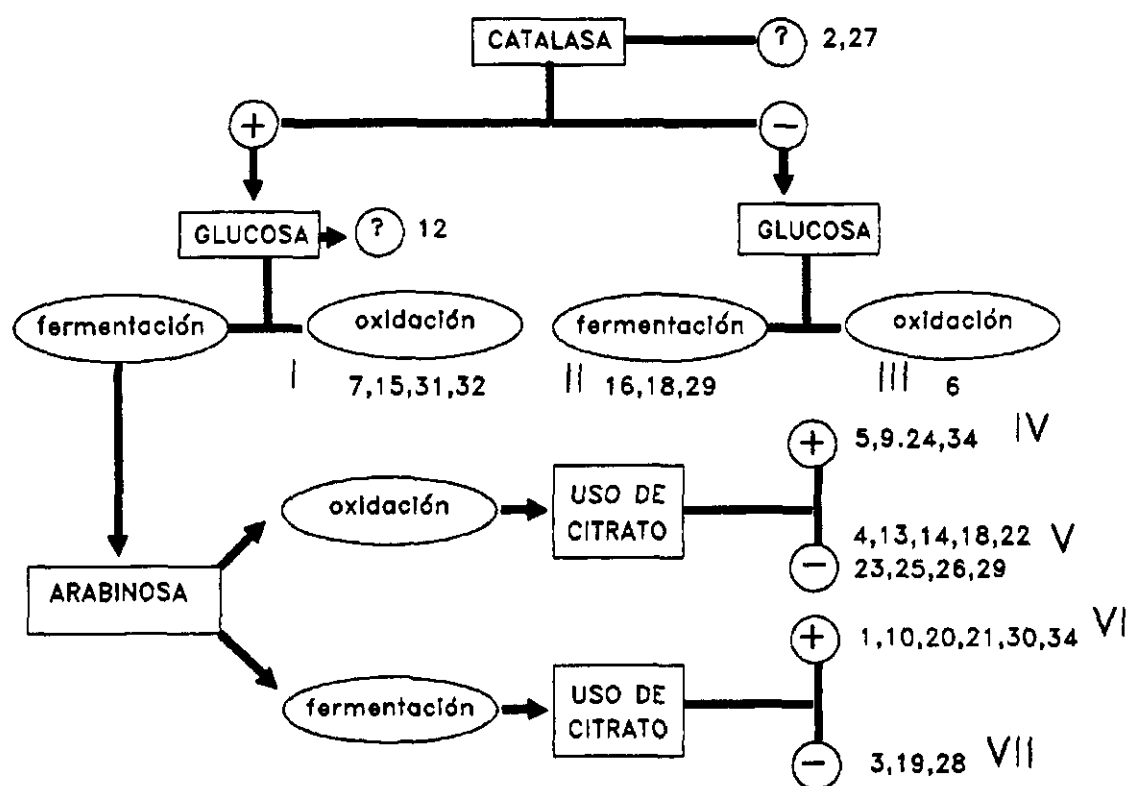


Figura 3.2. Protocolo para la identificación de grupos de especies del género Bacillus. 1 B. Subtilis 2 B. acidocladarius 3 B. alcalophilus 4 B. alvei 5 B. antracis 6 B. azotoformans 7 B. badius 8 B. brvis 9 B. cereus 10 B. circulans 11 B. coagulans 12 B. fastidiosus 13 B. firmus 14 B. globisporus 15 B. insolitus 16 B. larvae 17 B. latrosporus 18 B. letinorbus 19 B. lentus 20 B. licheniformis 21 B. macrans 22 B. macquarensis 23 B. marinus 24 B. megaterium 25 B. mycoides 26 B. panthotenicus 27 B. pausterii 28 B. polymyxa 29 B. popillae 30 B. pumillus 31 B. schelgelii 32 B. sphaericus 33 B. staerothermophilus 34 B. thuringensis

### **3.1.4. Análisis de los grupos funcionales del ciclo del nitrógeno**

Todos los medios de cultivo empleados en el análisis de los distintos grupos funcionales (ver apéndice A, A.II.2) se elaboraron según las técnicas de Pochon y Tardieux (1962). También aparece en el apéndice la composición de los reactivos empleados en este apartado.

Cada una de las bacterias pertenecientes al género mayoritario del primer muestreo se inocularon por triplicado en los medios de cultivo, operando a continuación como se especifica para cada grupo fisiológico.

#### **a) Diazotrofos aerobios**

Se pusieron 5 ml del medio en tubos de 16x160 mm. Se taparon con tapones de metal y se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 110°C. Tras la inoculación los tubos mediante un asa de siembra, se incubaron en estufa a 33°C durante 15 días. A continuación se puso 1 ml de cada tubo en viales estériles de 12 ml de capacidad que se cerraron con tapones de goma estancos a los gases, fijándolos con una arandela metálica. Luego se extrajeron 1.2 ml de aire de cada vial que se reemplazaron por igual cantidad de acetileno. Los viales se incubaron a 28°C durante 24 horas. Los tubos en los que se detectó etileno se consideraron positivos. El etileno producido se detecto en el mismo equipo y con el mismo protocolo al descrito en el apartado 2.7.1.

#### **b) Diazotrofos anaerobios**

Se pusieron 10 ml de medio en tubos de 16x160 mm y en cada tubo se introdujo una campana Durham. Se taparon con tapones metálicos y se esterilizaron en autoclave a 110°C durante 20 minutos. Tras la inoculación con asa de siembra, se incubaron en estufa a 28 °C durante 15 días.

Se consideraron positivos los tubos en los que tras la incubación había desprendimiento de gas.

#### **c) Amonificantes**

Se pusieron 10 ml del medio en tubos de 16x160mm que se taparon con tapones metálicos y se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 110°C. Tras la inoculación con asa de siembra, los tubos se incubaron en estufa a 28°C durante 15 días.

Después de la incubación se retiró con una pipeta estéril 1 ml de cada tubo que se pasó a otro tubo al que se le añadieron dos gotas del reactivo de Nessler. Se consideraron positivos los tubos en los que el color amarillo viró a anaranjado.

**d) Nitrificantes nitrosos**

Se puso 1 ml del medio en tubos de hemolisis de 16x160mm. Se taparon con tapones metálicos y se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 110°C. Tras la inoculación con asa de siembra, se incubaron en estufa a 28°C durante 40 días.

Después de la incubación se retiraron con una pipeta estéril 0.2 ml de cada tubo que se pasaron a un tubo eppendorf donde se añadieron 10 gotas de ácido sulfúrico concentrado y 10 gotas de difenilamina sulfúrica y se consideraron positivos los que presentaron la coloración azul.

**e) Nitrificantes nítricos**

Se pusieron 3 ml del medio en tubos de 16x160 mm. Se taparon con tapones metálicos y se esterilizaron en el autoclave durante 20 minutos a 110°C. Tras la siembra con asa, los tubos se incubaron en estufa a 28°C durante 40 días.

Después de la incubación se tomaron 0.2 ml de cada tubo con una pipeta estéril y se pasaron a un eppendorf al que se les añadieron 50 mg de urea, 10 gotas de sulfúrico concentrado y 10 de difenilamina sulfúrica. Se consideraron positivos aquellos tubos que presentaron coloración azul.

**f) Desnitrificantes**

Se pusieron 10 ml del medio en tubos de 16x160 mm. Se taparon con tapones metálicos y se esterilizaron en autoclave durante 20 minutos a 110°C. Tras la inoculación con asa de siembra, se incubaron en estufa a 28 °C durante 15 días.

Después de la incubación se retiraron con un pipeta estéril 0.2 ml de cada tubo que se pasaron a tubos eppendorf. Se realizó la prueba de los nitratos según se ha descrito en el caso de los microorganismos nitrificantes nítricos pero en este caso se consideraron positivos los tubos en los que no se detectó la presencia de nitratos.

### 3.2. Efectos de las rizobacterias mayoritarias sobre la germinación y crecimiento de Alnus glutinosa. Descripción general del procedimiento.

Al diseñar las experiencias para estudiar los efectos de las rizobacterias sobre las plantas se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones:

(i) Qué parámetros biométricos, fisiológicos o químicos se deberían ensayar en las plantas germinadas o crecidas bajo el efecto de las rizobacterias, para demostrar su efecto sobre ellas. En este sentido hemos considerado útil comprobar la capacidad de germinación y el desarrollo de la planta durante las primeras etapas de su crecimiento, tanto en plantas noduladas como sin nodular. También se han considerado parámetros como el nitrógeno total y los referentes a la estima sobre la capacidad de fijación de nitrógeno mediante el ARA y otros de tipo indirecto, como número de nódulos, lóbulos por nódulo, producción de CO<sub>2</sub> por estos y peso nodular.

(ii) La forma de establecer la relación entre las rizobacterias y las plantas. Las posibilidades al respecto son dos: bien, tal y como hacen autores como Alström (1987), inoculando una cantidad determinada de bacterias por planta o bien añadiendo a la planta el medio donde han crecido las bacterias, eliminando estas por centrifugado y filtración. Se optó por ese segundo procedimiento por motivos que se discuten más adelante.

Tanto en el caso de los ensayos de germinación como de desarrollo se realizaron con dos concentraciones de medio de crecimiento bacteriano: 10% y 20%.

#### 3.2.1. Selección de cepas de rizobacterias ensayadas

Para los ensayos biológicos se hizo una selección de las 156 cepas bacterianas de los grupos mayoritarios de la rizosfera de Alnus glutinosa, obtenidas como se reseñó en 3.1.2.

La selección se hizo al azar, tomando el 20% de las bacterias mayoritarias de cada estación del siguiente modo (tabla 3.I):

Tabla 3.I. Bacterias seleccionadas para la realización de las pruebas biológicas. La formación de los grupos a los que se hace referencia se describe en el apartado 3.1.3.

<u>ESTACION</u>	<u>BACTERIAS</u>	<u>GRUPO</u>	<u>Nº TOTAL</u>	<u>SELECCIONADAS</u>
Primavera	<u>Pseudomonas</u>	A	17	4
Primavera	<u>Pseudomonas</u>	B	1	0
Primavera	<u>Pseudomonas</u>	C	1	0
Primavera	<u>Bacillus</u>	I	0	0
Primavera	<u>Bacillus</u>	IV	1	0
Primavera	<u>Bacillus</u>	V	1	0
Primavera	<u>Bacillus</u>	VI	7	2
Primavera	<u>Bacillus</u>	VII	9	2
Verano	<u>Pseudomonas</u>	A	14	3
Verano	<u>Pseudomonas</u>	B	2	0
Verano	<u>Pseudomonas</u>	C	1	0
Otoño	<u>Bacillus</u>	I	2	0
Otoño	<u>Bacillus</u>	IV	6	0
Otoño	<u>Bacillus</u>	V	3	0
Otoño	<u>Bacillus</u>	VI	18	4
Otoño	<u>Bacillus</u>	VII	18	4
Invierno	<u>Bacillus</u>	I	1	0
Invierno	<u>Bacillus</u>	IV	6	0
Invierno	<u>Bacillus</u>	V	3	0
Invierno	<u>Bacillus</u>	VI	22	4
Invierno	<u>Bacillus</u>	VII	22	4
<b>TOTAL</b>			<b>156</b>	<b>27</b>

Como se puede ver la selección se direccionó a las bacterias de los grupos que aparecen en mayor número. Con las bacterias seleccionadas se efectuaron las pruebas biológicas en las cuales se abordan los diferentes parámetros biométricos, químicos y fisiológicos.

### 3.2.2. Preparación del medio de cultivo bacteriano

Como se señaló en el apartado 3.2., para comprobar el efecto de las bacterias seleccionadas sobre las plantas se empleó el medio donde crecieron dichas bacterias.

Cada una de las 27 colonias citadas en 3.2.1., se sembraron en matraces de 250 ml que contenían 100 ml del siguiente medio:

Caldo nutritivo (Difco)..... 4 g  
Extracto de tierra ..... 999 ml  
Sol. Oligoelementos ..... 1 ml

Se incubaron a 26°C y agitación 85 U/min, hasta que el medio alcanza una transmitancia aproximadamente de 30 a una longitud de onda de 600 nm. Se empleó un colorímetro SPECTRONIC 20 (Milton Roy Company).

Finalizada la incubación se centrifugó el medio en tubos de plástico estéril a 5000 rpm durante 5 minutos, en una centrífuga de mesa Selecta Espiral-6. El sobrenadante se conservó en alícuotas de 50 ml a -20°C.

### 3.2.3. Semillas y plantas de Alnus glutinosa empleadas en los ensayos

Las semillas de Alnus glutinosa utilizadas en las pruebas biológicas se recolectaron en los lugares y fechas siguientes:

<u>LOCALIDAD</u>	<u>ARBOL</u>	<u>FECHA</u>
Murguía, Alava. Río Ugalde	M1	Oct. 1993
Murguía, Alava. Río Ugalde	M2	Nov. 1993
Murguía, Alava. Río Ugalde	M3	Nov. 1993
Guisando, Avila. Aº Tórtolas	2.2	Oct. 1991
Guisando, Avila. Aº Tórtolas	2.2	Oct. 1992
Guisando, Avila. Aº Tórtolas	1.3	Oct. 1992
Humanes, Guadalajara. Río Sorbe	A	Nov. 1991
Humanes, Guadalajara. Río Sorbe	B	Nov. 1991
Humanes, Guadalajara. Río Sorbe	C	Nov. 1990



Las semillas han de cumplir la doble característica de un alto porcentaje de germinación y poca variación tanto en el tiempo de germinación como en la velocidad de crecimiento de la plántula. Para ello se sembraron 900 semillas (100 de cada una de las localidades y árboles de la tabla) estableciéndose un porcentaje de germinación del 92%.

Por otra parte y con el fin de establecer el grado de variabilidad genética en las semillas en Alnus, se efectuaron electroforesis en geles de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) según el método de Payane et. al. (1981), sobre las proteínas de reserva de 60 semillas de las distintas colecciones. Esta técnica se emplea habitualmente como indicador de dicha variación. Las proteínas de reserva parecen estar en relación con la velocidad de germinación, crecimiento y desarrollo en los primeros estadios.

Extracción de proteínas. Cada semilla se maceró en el interior de un tubo eppendorf, y se suspendió en tampón de extracción (1 mg semilla : 25 µl tampón, véase apéndice A, A.II.3), durante una hora, con agitación ocasional. Después se hirvieron durante un minuto y medio y se almacenan a 4°C hasta el momento de la electroforesis.

Electroforesis: De cada extracción se insertaron 7µl en geles de SDS-Poliacrilamida (SDS-PAGE) al 17.5%, con un gel "stacking" al 3%, que separa las proteínas en función del peso molecular. La composición de los geles se recoge en el apéndice A (A.II.4).

Las electroforesis se desarrollaron durante 16 horas a voltaje constante (50 V), quedando el frente señalado por la pironina Y al borde del gel.

Tinción: Los geles se dejaron teñir durante 24 horas en agitación continua en una disolución de azul de coomassie R250 al 2%, etanol al 5% y ácido tricloroacético al 6%. Para desteñir el fondo se utilizó agua destilada durante tres o cuatro días, también en continua agitación aclarándose finalmente con acético al 7%.

Almacenamiento definitivo: Se dejaron los geles en una solución de glicerina al 5% durante 24 horas, tras lo cual se dispusieron en un cristal, entre dos hojas de papel celofán empapadas en la misma solución, dejándose secar entre una semana y semana y media.

#### 3.2.4. Ensayos de germinación

Las semillas empleadas para los ensayos de germinación se sometieron a vernalización. Para ello se mantuvieron 15 días en arena lavada húmeda a 4°C. Una vez transcurridos los 15 días se esterilizaron superficialmente tratando durante 2 minutos con hipoclorito sódico (20 g/l). Posteriormente se aclararon 5 veces con agua destilada y estéril.

Se dispusieron 10 semillas en placas petri, equidistantes, haciéndose tres réplicas por concentración de medio de crecimiento bacteriano ensayado. El medio de soporte de las semillas fue el que a continuación se reseña:

Agar-agar	12	g
Crone con N	2.5	g
Sol. de oligoelementos	1	ml
Ac. Propiónico	0.01	ml

El medio se esterilizó a 120°C durante 20 minutos y se sirvieron 15 ml en las placas. Antes de que el medio de soporte solidificase se añadió medio de crecimiento bacteriano al 10 o al 20%, según procediera.

El medio de crecimiento bacteriano (obtenido tal y como se reseñó en el apartado 3.2.2.) se descongeló y antes de agregarlo al medio de soporte se pasó por un filtro Millex-GS (Millipore), para eliminar células que en la centrifugación hubiesen podido quedar en el sobrenadante.

Las placas con las semillas se mantuvieron 7 días en un cámara de cultivo ASL, con un fotoperiodo de 14 horas de luz (a 25°C) y 10 de oscuridad (a 15°C). Cada 24 horas se contabilizaba el número de semillas germinadas.

Paralelamente se hicieron controles en las mismas condiciones (10 y 20%) con medio de crecimiento estéril (figura 3.3).

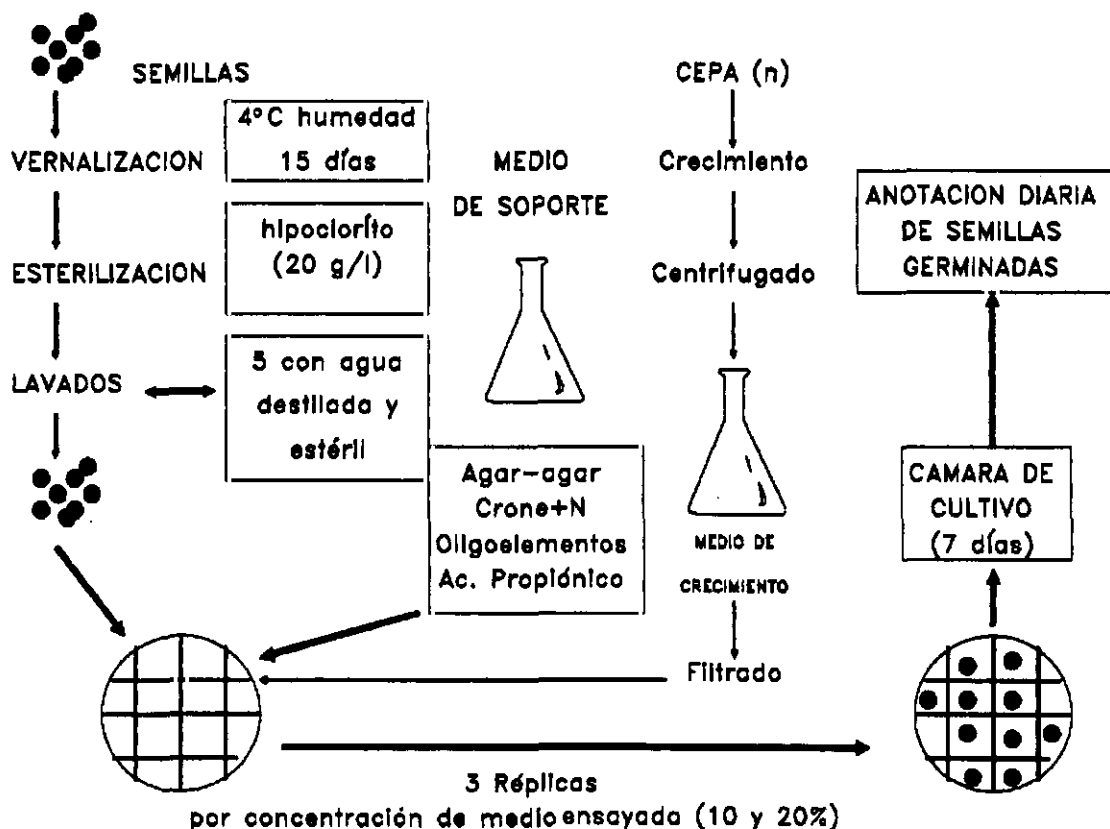


Figura 3.3. protocolo seguido en el ensayo de los medios de crecimiento de las bacterias rizosféricas sobre la germinación.

### 3.2.5. Ensayos de crecimiento con plantas sin nodular y noduladas

#### a) Ensayo con plantas sin nodular

El protocolo seguido se esquematiza en la figura 3.4. Las semillas se sometieron al mismo proceso de vernalización y esterilización superficial descritos en el apartado anterior. A continuación se sembraron en bandejas de plástico de 35 x 25 x 8 cm, esterilizadas previamente con etanol al 96%. Las bandejas contenían vermiculita (Termita nº3) esterilizada en autoclave a 120°C

durante 20 minutos. En cada bandeja se dispusieron 200 semillas y se regaron con una solución de Crone con N estéril. Las bandejas se cubrieron con papel "Glad" y se mantuvieron en la cámara de cultivo con el fotoperiodo y temperatura descritas en el apartado anterior.

Durante los primeros estadios tras la germinación se regaron las bandejas con la solución de Crone con N. Cuando las plántulas presentaban 5 hojas (2 cotiledones y 3 catáfilos) se procedió al ensayo.

Vasos de precipitados de 500 ml con 75 g de vermiculita se esterilizaron en autoclave a 120°C durante 20 minutos. En cada vaso se adicionaron 184 ml de solución Crone con N y 46.5 ml de medio de crecimiento bacteriano (ensayos al 20%) o 207 ml de solución Crone con N y 23.5 ml de medio de crecimiento bacteriano (ensayos al 10%). Los medios adicionados se filtraron del mismo modo que se describe en el apartado anterior.

En cada vaso se dispusieron, en condiciones asépticas, tres plántulas y se cerró cada vaso con papel "Glad" finamente perforado. Las plantas empleadas se seleccionaron siempre entre las que presentaban buen aspecto, evitando las que mostraban signos de necrosis foliar o marchitez. Los vasos se mantuvieron en la cámara de cultivo durante 20 días, en las condiciones anteriormente descritas y sin regar.

Paralelamente se hicieron controles en las mismas condiciones (10 y 20%) con medio de cultivo estéril, que no había soportado el crecimiento bacteriano.

Finalizado el período de 20 días, las plantas se sacaron de los vasos, se retiró cuidadosamente la vermiculita adherida al aparato radical y se prensaron extendiéndose tanto raíces como hojas de tal modo que quedasen en un plano. Los parámetros que se estudiaron en este grupo de plantas fueron: (a) superficie total de la parte aérea, (b) longitud total de la parte aérea, (c) número de hojas, (d) longitud radical, (e) superficie radical y (f) nitrógeno total.

Las medidas biométricas (a, b, c, d, y e) se efectuaron con un equipo de Análisis de Imagen Delta-T (Delta-T Devices Inc., Inglaterra) con un soporte de software tipo "Días". El nitrógeno total se midió siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.6.1.d., empleándose para la digestión el total de la planta, previa pesada en balanza de precisión (4 cifras decimales).

#### **b) Ensayo con plantas noduladas.**

El protocolo seguido se esquematiza en la figura 3.5. Las semillas se sometieron al mismo proceso de vernalización, esterilización superficial y se dispusieron e incubaron del mismo modo que se describe en el apartado anterior, regándose inicialmente con solución Crone sin N. Transcurrida la germinación y cuando los alisos apuntaban el primer par de catáfilos se regaron con un macerado de nódulos radicales de Alnus glutinosa a fin de nodular las plántulas.

Para la nodulación de las plántulas se procedió tal y como se detalla en el apartado 2.5.2. Los riegos con macerado nodular se alternaron a diario con riegos con solución crone sin N. Para ello se empleó una jeringuilla de 5 ml estéril regándose planta a planta. Cuando las plántulas presentaban 5 hojas (2 cotiledones y 3 catáfilos) se procedió al ensayo.

Vasos de precipitados 500 ml con 75 g de vermiculita se esterilizaron en autoclave a 120°C durante 20 minutos. En cada vaso se adicionaron 184 ml de solución Crone sin N y 46.5 ml de medio de crecimiento bacteriano (ensayos al 20%) o 207 ml de solución Crone sin N y 23.5 ml de medio de crecimiento bacteriano (ensayos al 10%). Al adicionar los medios se filtraron del mismo modo que se describe en el apartado anterior.

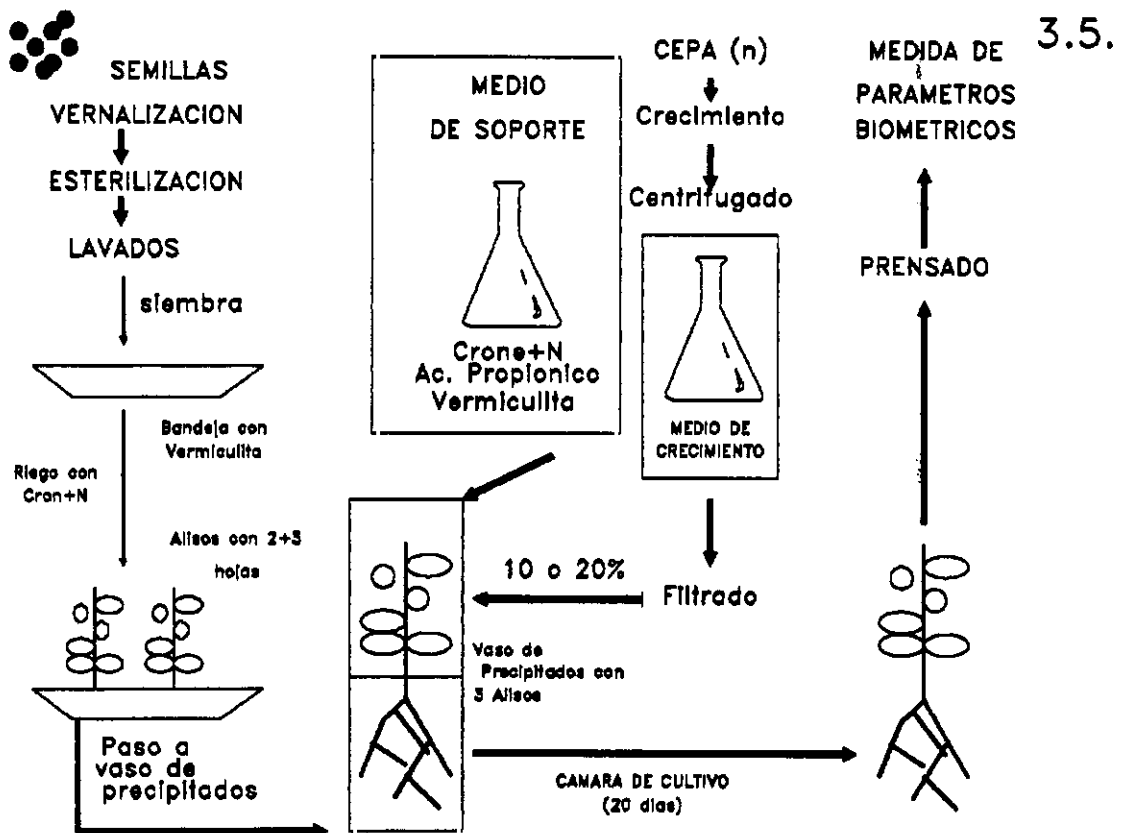
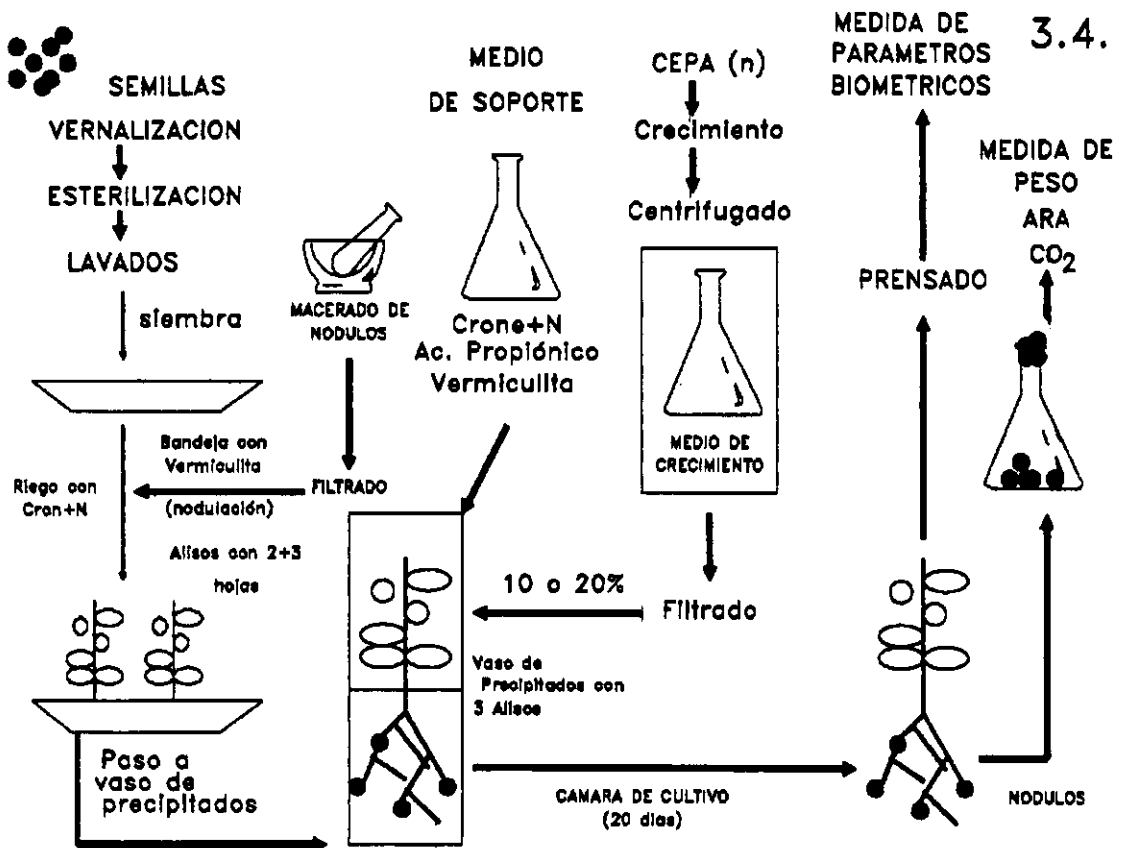
En cada vaso se dispusieron, en condiciones asépticas, tres plántulas y se cerró cada vaso con papel "Glad" finamente perforado. Las plantas empleadas se seleccionaron siempre entre las que presentaban buen aspecto y nódulos perfectamente diferenciados, evitando las que mostrasen signos de necrosis foliar o marchitez. Los vasos se mantuvieron en la cámara de cultivo durante 20 días, en las condiciones anteriormente dadas y sin regar. Paralelamente se hicieron controles en las mismas condiciones (10 y 20%) con medio de crecimiento estéril.

Finalizado el período de 20 días, las plantas se sacaron de los vasos de precipitados y se retiró cuidadosamente la vermiculita adherida al aparato radical.

En cada planta se estudiaron los siguientes parámetros: (a) superficie total de la parte aérea, (b) longitud total de la parte aérea, (c) número de hojas, (d) longitud radical, (e) superficie radical, (f) nitrógeno total, (g) lóbulos por nódulo, (h) ARA, (i) producción de CO<sub>2</sub> por nódulos y (j) peso nodular.

Para las medidas biométricas (a, b, c, d, y e ) se procedió tal y como se ha descrito anteriormente. El nitrógeno total se midió siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.6.1.d., empleándose para la digestión el total de la planta, previa pesada en balanza de precisión (4 cifras decimales).

En el resto de los parámetros se procedió del siguiente modo: en cada planta se separaron los nódulos anotándose el número lóbulos nodulares (g). Los nódulos de cada planta se introdujeron en un vial de vidrio de 15 ml, se cerraron estancamente y se sustituyó el 10 % de la atmósfera del vial por acetileno. Los viales se incubaron durante una hora analizándose el etileno y CO<sub>2</sub> producido con el equipo y método descrito en los apartados 2.7.1. y 2.7.5. respectivamente. De este modo se midieron los parámetros (h) y (i). Posteriormente se pesaron los nódulos en una balanza de precisión con cuatro cifras decimales.



Figuras 3.4 y 3.5. protocolo seguido en el ensayo de los medios de crecimiento de las bacterias rizosféricas sobre el crecimiento de plantas noduladas (PN) y sin nodular (PSN).

### 3.3. Tratamiento de la información

#### 3.3.1. Variación estacional de las rizobacterias de Alnus glutinosa

En esta parte del estudio se ha trabajado con variables fisicoquímicas y bióticas, tales como la frecuencia de los géneros bacterianos. Aunque los métodos empleados son de uso bastante generalizado, están expuestos a posibles errores experimentales, si bien la eficiencia y limitaciones de dichos métodos están suficientemente probadas. Las mediciones en cada prueba (tanto fisicoquímicas como bióticas) se han hecho sin seguir orden en las réplicas, por lo que el error experimental es aleatorio. Así pues, la distribución de una variable determinada y sus errores se pueden considerar como aleatorios, o al menos lo suficientemente parecidos para permitir el empleo de pruebas paramétricas en el contraste de las hipótesis formuladas.

Se ha hecho una ordenación de los valores medios de los datos, mediante un análisis de componentes principales (ACP) (Harman, 1967), con el objeto de descomponer la varianza total de la muestra en una serie de factores de variación, donde quede reflejada la importancia de cada una de las variables, así como la influencia del conjunto de variables en la dispersión de las muestras analizadas.

Para la comparación de los datos se ha empleado el análisis de la varianza (ANOVA) bidireccional con réplicas y dos factores de variación, géneros y estaciones (Sokal y Rohlf, 1979).

Cuando dichos factores influyen significativamente al nivel del 95% (\*) o del 99% (\*\*), se procede a la comparación de la media mediante el test estadístico LSD (mínima diferencia significativa) (Sokal y Rohlf, 1979).

#### 3.3.2. Efecto de las bacterias mayoritarias sobre la germinación de Alnus glutinosa

A partir de los resultados acumulativos de germinación se construyó una matriz con las medias de las tres réplicas (para cada cepa y concentración). Dicha matriz se sometió a un ACP.

Para establecer la significación estadística de los grupos encontrados por el ACP se realizaron ANOVAs de las pendientes de las rectas resultantes de la



media de germinación acumulativa de los tres grupos de bacterias a las dos concentraciones ensayadas.

Finalmente, para establecer la significación estadística en cuanto al efecto inhibitorio o activador de las cepas ensayadas sobre la germinación, se efectuaron nuevos ANOVAs de las pendientes de las rectas resultantes de la germinación acumulativa de dichas cepas y los respectivos controles.

### 3.3.3. Efecto de las bacterias mayoritarias sobre el crecimiento de Alnus glutinosa

Con los resultados de los experimentos de desarrollo se construyeron tres matrices:

(i) la primera se construyó con las medias de las tres réplicas de cada cepa ensayada, y considerando separadamente las dos concentraciones de medio de crecimiento bacteriano ensayado sobre PN y PSN.

(ii) Una segunda matriz se efectuó con de las medias de los resultados de los 6 parámetros considerados en PSN.

(iii) Finalmente se elaboró una tercera matriz, análoga a la anterior, pero con los resultados de PN.

Cada una de estas tres matrices se sometieron a un ACP con el fin de generar grupos de respuestas (efecto cepas, efecto concentración, efecto planta -PN o PSN- o combinaciones de estos). Los resultados de esta ordenación se corroboran estadísticamente mediante ANOVAs unidireccionales sobre los distintos parámetros.

#### **4. RESULTADOS DEL ESTUDIO DE LA INTERACCION EN EL SENTIDO PLANTA-SUELO**

Como ya se ha indicado en el capítulo anterior, el estudio del efecto de la planta sobre las comunidades microbianas edáficas se realizó utilizando como sustrato 4 suelos diferentes. A continuación se describen dichos suelos desde un punto de vista fisicoquímico y microbiológico, refiriéndose este último a las actividades fisiológicas encuadradas dentro del ciclo del nitrógeno y actividad total como producción de CO<sub>2</sub>.

#### 4.1. Caracterización de los suelos

Los valores de los parámetros fisicoquímicos se indican en la tabla 4.I y se representan en la figura 4.1. Las actividades de los grupos funcionales del ciclo del nitrógeno y producción de CO<sub>2</sub> se indican en la tabla 4.II y figura 4.2. Todos los resultados expresados en las tablas corresponden a la media aritmética de tres réplicas por muestra y tres repeticiones por réplica. Las variables fisicoquímicas resultan ser significativamente diferentes en los tres suelos, tal como denota el ANOVA (tabla 4.III). También las diferencias son significativas en cuanto a las actividades de los grupos funcionales.

Tabla 4.I. Caracterización de los suelos. Parámetros fisicoquímicos. Unidades: C orgánico (%); N total (mg N/g suelo); N amonio y N nitrato (µg N amonio o N nitrato/ g suelo). Junto a cada resultado aparece el error estándar.

	Suelo A	Suelo B	Suelo C	Suelo D
pH	7.30 ± .01	4.30 ± .00	8.01 ± .02	7.13 ± .01
C orgánico	1.84 ± .04	6.36 ± .12	0.32 ± .05	2.80 ± .26
N total	12.5 ± .22	9.54 ± .22	1.19 ± .04	10.6 ± .21
N amonio	2.68 ± .31	4.71 ± .31	0.78 ± .09	12.6 ± .24
N nitrato	1.53 ± .14	2.45 ± .25	1.17 ± .04	5.45 ± .28

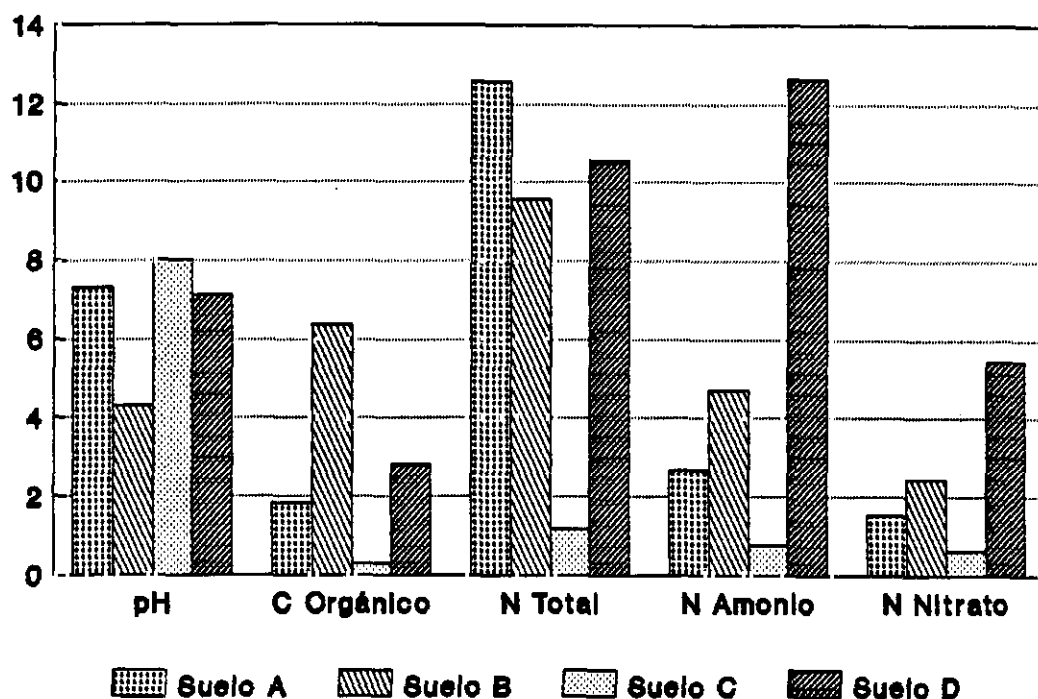


Figura 4.1. Caracterización de los suelos. Parámetros fisicoquímicos. Unidades: C orgánico (%); N total (mg N/g suelo); N amonio y N nitrato (µg N amonio o N nitrato/ g suelo).

Tabla 4.II. Caracterización de los suelos. Actividades de los grupos fisiológicos y producción de CO<sub>2</sub>. Unidades: Fijación (ARA) (nmol C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>/g suelo/hora); Tasa de mineralización (día<sup>-1</sup>); Nitrificación (producción total neta de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en ppm/ día); Desnitrificación (nmol N<sub>2</sub>O/g suelo/hora); Producción de CO<sub>2</sub> (nmol de CO<sub>2</sub>/g suelo/hora). Junto a cada resultado aparece el error estándar.

	Suelo A	Suelo B	Suelo C	Suelo D
ARA	0.410 ± .02	0.140 ± .00	0.001 ± .00	0.591 ± .06
Mineral.	0.072 ± .01	0.053 ± .03	0.020 ± .01	0.073 ± .00
Nitrif.	0.300 ± .04	0.15 ± .03	0.00 ± .00	0.70 ± .06
Desnitrif.	1.940 ± .03	0.89 ± .03	0.09 ± .00	0.75 ± .08
Prd.CO <sub>2</sub>	74.40 ± 2.66	78.6 ± 2.08	21.7 ± .66	57.0 ± 1.36

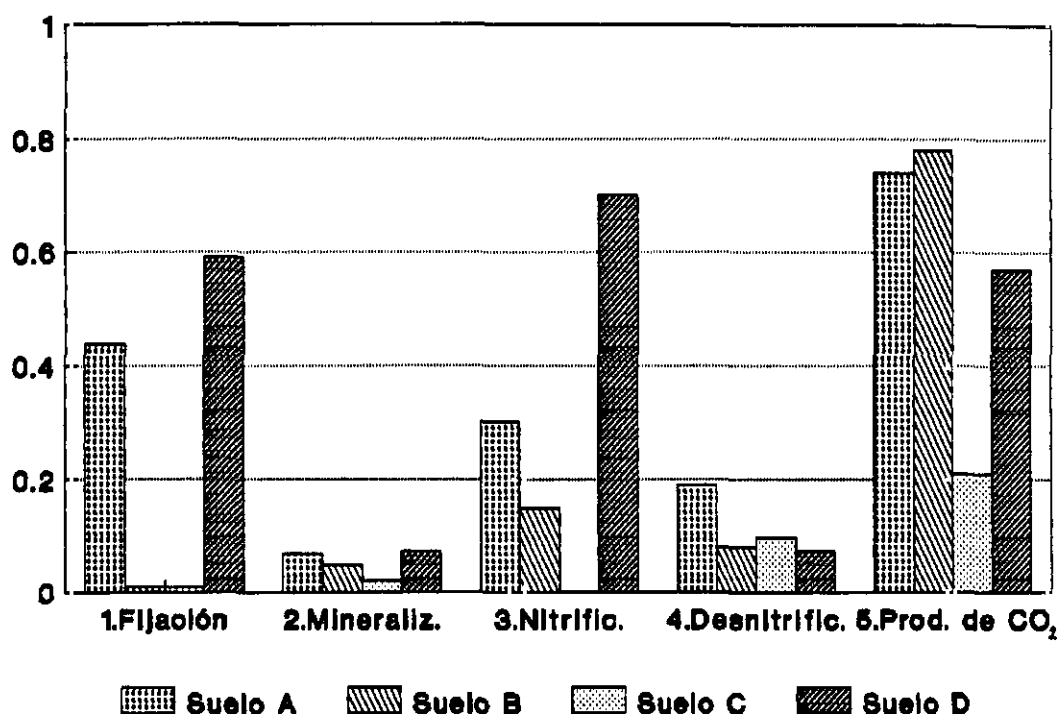


Figura 4.2. Caracterización de los suelos. Actividades de los grupos fisiológicos y producción de CO<sub>2</sub>. Unidades: Fijación (ARA) (nmol C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>/g suelo/hora); Tasa de mineralización (día<sup>-1</sup>); Nitrificación (producción neta de NO<sub>3</sub><sup>-</sup> en ppm); Desnitrificación (nmol N<sub>2</sub>O/g suelo/hora x 10<sup>-1</sup>); Producción de CO<sub>2</sub> (nmol de CO<sub>2</sub>/g suelo/hora x 10<sup>-2</sup>).

Tabla 4.III. Valores de F, P y significación de los ANOVAS realizados con los datos de los parámetros estudiados en la caracterización de suelos.

	Valor de F	P	Significación
pH	6760.70	< 10 <sup>-6</sup>	**
C orgánico	61.40	7.5 x 10 <sup>-5</sup>	**
N total	4445.01	< 10 <sup>-6</sup>	**
N amonio	265.48	< 10 <sup>-6</sup>	**
N nitrato	62.40	6.9 x 10 <sup>-6</sup>	**
ARA	48.20	1.8 x 10 <sup>-5</sup>	**
Mineralización	28.45	1.2 x 10 <sup>-4</sup>	**
Nitrificación	4.38	0.04210	*
Desnitrificación	29.03	1.1 x 10 <sup>-4</sup>	**
Producción de CO <sub>2</sub>	121.84	< 10 <sup>-6</sup>	**

## 4.2. Caracterización de los exudados nodulares y radicales

### 4.2.1. Caracterización fisicoquímica

Los resultados obtenidos en el análisis fisicoquímico de los exudados nodulares y radicales aparecen en la tabla 4.IV y figura 4.3. Los datos corresponden a la media aritmética de tres réplicas y tres repeticiones por réplica. El ANOVA nos indica que tanto las concentraciones de exudados nodulares como las radicales, aportan diferencias significativas de todas las variables que se estudian ( $p < 0.01$ ) a excepción del N total ( $F=2.358$ ,  $p=0.1036$ ) y el N amonio ( $F=1.599$ ,  $p=0.2338$ ).

Tabla 4.IV. Caracterización de los exudados nodulares y radicales en las concentraciones ensayadas. Unidades: C orgánico (%); N total (mg N/ ml exudado); N amonio (mg  $\text{NH}_4^+$ / ml exudado  $\times 10^{-1}$  en los nodulares y  $10^{-3}$  en los radicales); N nitrato (mg  $\text{NO}_3^-$  /ml exudado  $\times 10^{-4}$ ). Junto a cada resultado aparece el error estándar.

	NODULARES.			RADICALES.		
	10 %	5 %	2%	10 %	5 %	2%
pH	4.27 $\pm$ .01	5.35 $\pm$ .04	5.56 $\pm$ .02	4.66 $\pm$ .01	5.20 $\pm$ .00	5.51 $\pm$ .00
C orgánico	2.05 $\pm$ .02	1.01 $\pm$ .00	0.52 $\pm$ .05	2.66 $\pm$ .01	1.92 $\pm$ .00	1.20 $\pm$ .01
N total	1.03 $\pm$ .09	0.51 $\pm$ .04	0.25 $\pm$ .02	1.30 $\pm$ .07	0.61 $\pm$ .07	0.46 $\pm$ .06
N amonio	0.20 $\pm$ .51	0.12 $\pm$ .00	0.04 $\pm$ .00	0.44 $\pm$ .00	0.16 $\pm$ .00	0.10 $\pm$ .00
N nitrato	2.52 $\pm$ .05	1.21 $\pm$ .04	0.05 $\pm$ .04	3.57 $\pm$ .00	1.73 $\pm$ .08	0.56 $\pm$ .00

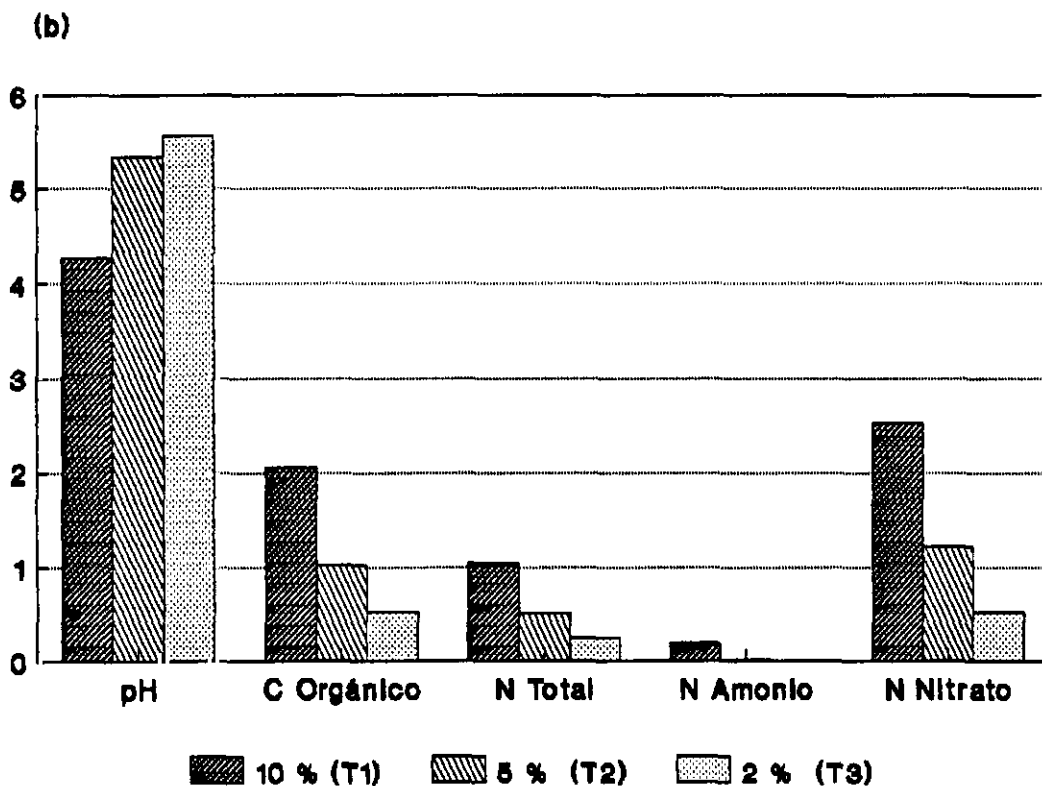
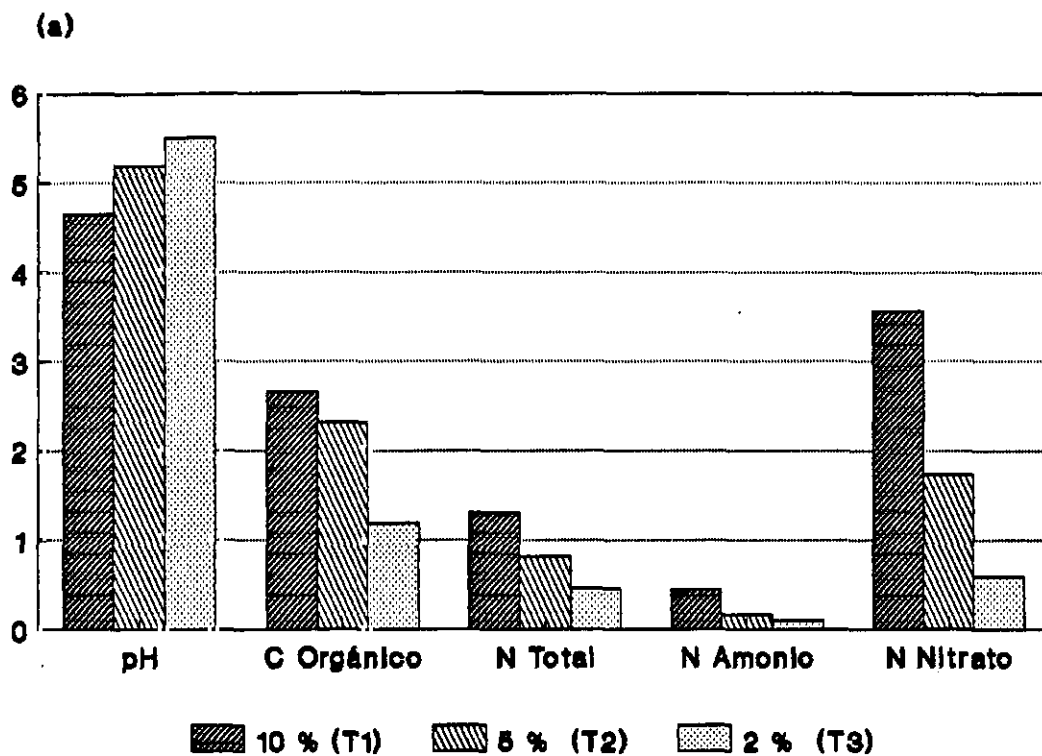


Figura 4.3. Resultados de la caracterización fisicoquímica de los exudados nodulares (a) y radicales (b). Unidades: C orgánico (%); N total (mg N/ ml exudado); N amonio (mg  $\text{NH}_4^+$ / ml exudado  $\times 10^{-1}$  en los nodulares y  $10^{-3}$  en los radicales); N nitrato (mg  $\text{NO}_3^-$ /ml exudado  $\times 10^{-4}$ ).

#### 4.2.2. Caracterización bioquímica

Todas las caracterizaciones descritas en este apartado se efectuaron en los exudados más concentrados.

La cuantificación proteica efectuada por el método de Lowry nos muestra que los exudados nodulares poseen una concentración de 0.0145 g/l de proteína mientras que por este método pero sin emplear el reactivo de Folin obtenemos una concentración de 0.0532 g/l. En los exudados radicales por el método de Lowry obtenemos una concentración de proteínas de 0.012 g/l y por este mismo método pero sin el reactivo de folin los resultados son de 0.0498 g/l.

El estudio efectuado sobre la composición cuantitativa de hidratos de carbono (figura 4.4) muestra que los azúcares presentes en los exudados nodulares y radicales son los mismos: lactosa, glucosa y xilosa. La identificación de estos no ofrece dudas pues presentan idénticos Rf que los patrones empleados (22.79, para la lactosa, 44.11 para la glucosa y 54.41 para la Xilosa).

El análisis de los lípidos presentes en los exudados nos muestra que los exudados radicales en las condiciones ensayadas poseen una concentración de 0.000415 g de lípidos por ml de exudado (en el caso de los más concentrados, es decir al 10%), los nodulares presentan una concentración de 0.00095 g de lípidos por ml de exudado.

El análisis cualitativo de lípidos (figura 4.5) muestra que en ambos tipos de exudados hay nueve tipos diferentes, que desde el punto de aplicación hacia el frente son: fosfolípidos (1), monoglicéridos (2), diglicéridos (3), esteroides (4), ácidos grasos libres (5), triglicéridos (6) y ésteres de esteroides (7). La segunda banda empezando por el frente (triglicéridos) presenta un Rf algo distinto en los exudados nodulares (65.26) y los radicales (62.87) por lo que presumimos que pueda tratarse de un éster diferente en cada caso.



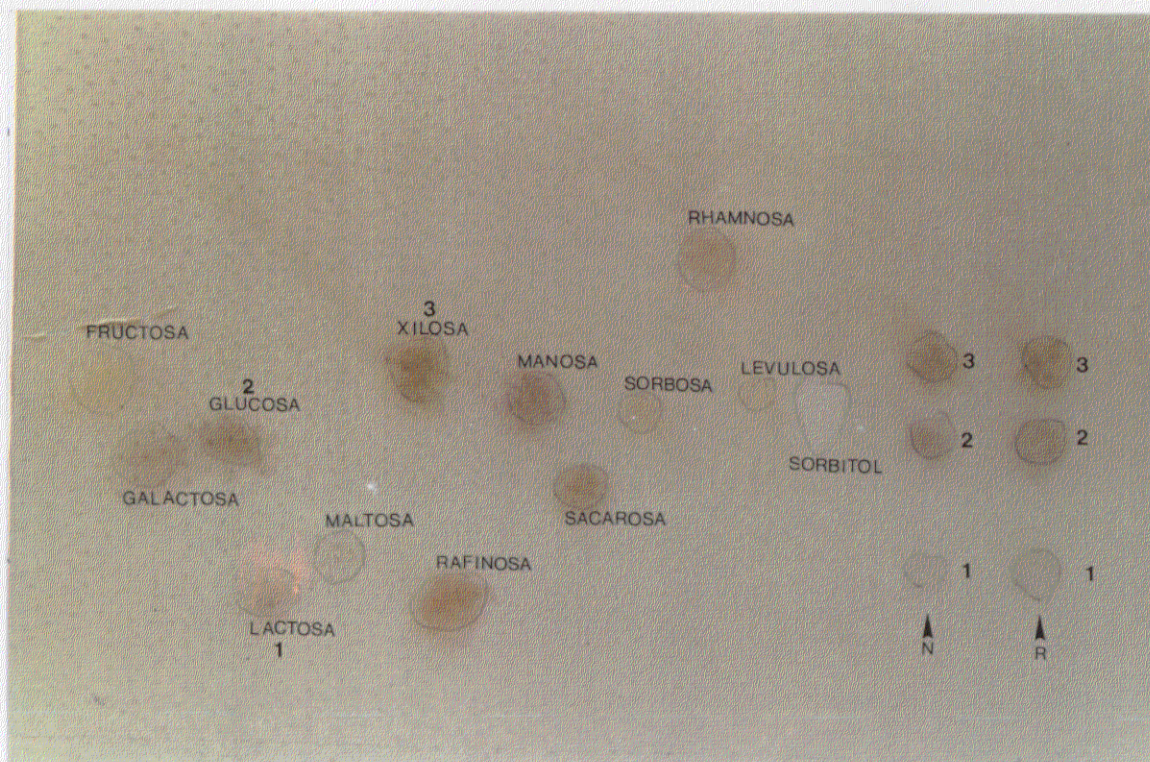


Figura 4.4. Cromatograma de azúcares de los exudados nodulares (N) y radicales (R) con sus respectivos patrones.

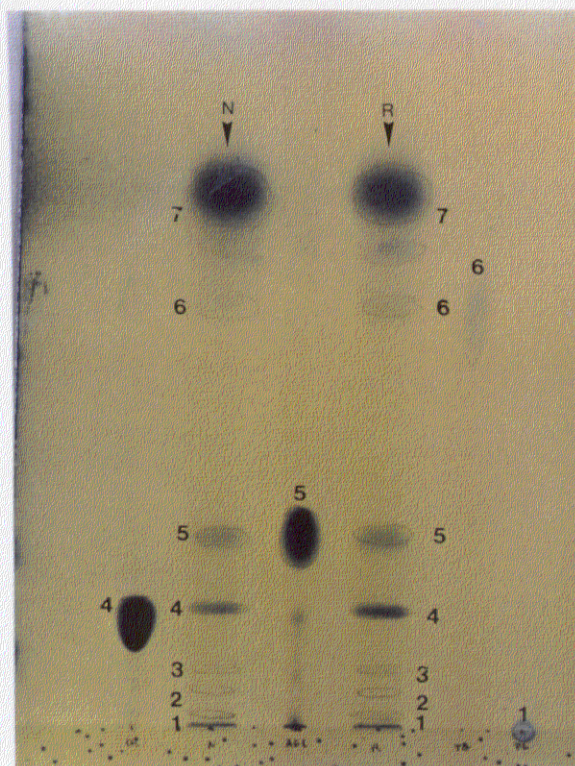


Figura 4.5. Cromatograma de lípidos de los exudados nodulares (N) y radicales (R) con sus respectivos patrones.



### 4.3 Caracterización de los exudados en plantas noduladas y sin nodular

#### 4.3.1. Caracterización fisicoquímica

Los resultados aparecen en la tabla 4.V y figura 4.6. Como en los casos precedentes, los datos corresponden a la media aritmética de tres réplicas y tres repeticiones por réplica. El ANOVA nos indica que las concentraciones de los medios de cultivo hidropónico aportan una modificación significativa ( $p < 0.01$ ) de todas las variables consideradas.

Tabla 4.V. Caracterización de los exudados de plantas noduladas y sin nodular en las concentraciones ensayadas. Unidades: C orgánico (%); N total (mg N/ ml exudado); N amonio ( $\mu\text{g NH}_4^+/\text{ml} \times 10^{-2}$ ); N nitrato ( $\mu\text{g NO}_3^-/\text{ml}$  exudado). Junto a cada resultado aparece el error estándar.

	NODULADAS			SIN NODULAR		
	100%	50%	25%	100%	50%	25%
pH	4.02 $\pm$ .00	4.32 $\pm$ .00	4.68 $\pm$ .02	4.00 $\pm$ .01	4.33 $\pm$ .01	4.86 $\pm$ .02
C orgánico	4.01 $\pm$ .01	2.10 $\pm$ .00	1.04 $\pm$ .00	2.36 $\pm$ .01	1.15 $\pm$ .16	0.68 $\pm$ .00
N total	0.85 $\pm$ .00	0.42 $\pm$ .01	0.25 $\pm$ .04	0.23 $\pm$ .00	0.10 $\pm$ .00	0.05 $\pm$ .00
N amonio	0.14 $\pm$ .00	0.07 $\pm$ .00	0.03 $\pm$ .00	0.08 $\pm$ .00	0.04 $\pm$ .00	0.02 $\pm$ .00
N nitrato	3.11 $\pm$ .08	1.50 $\pm$ .00	0.75 $\pm$ .06	5.02 $\pm$ .04	2.53 $\pm$ .04	1.30 $\pm$ .00

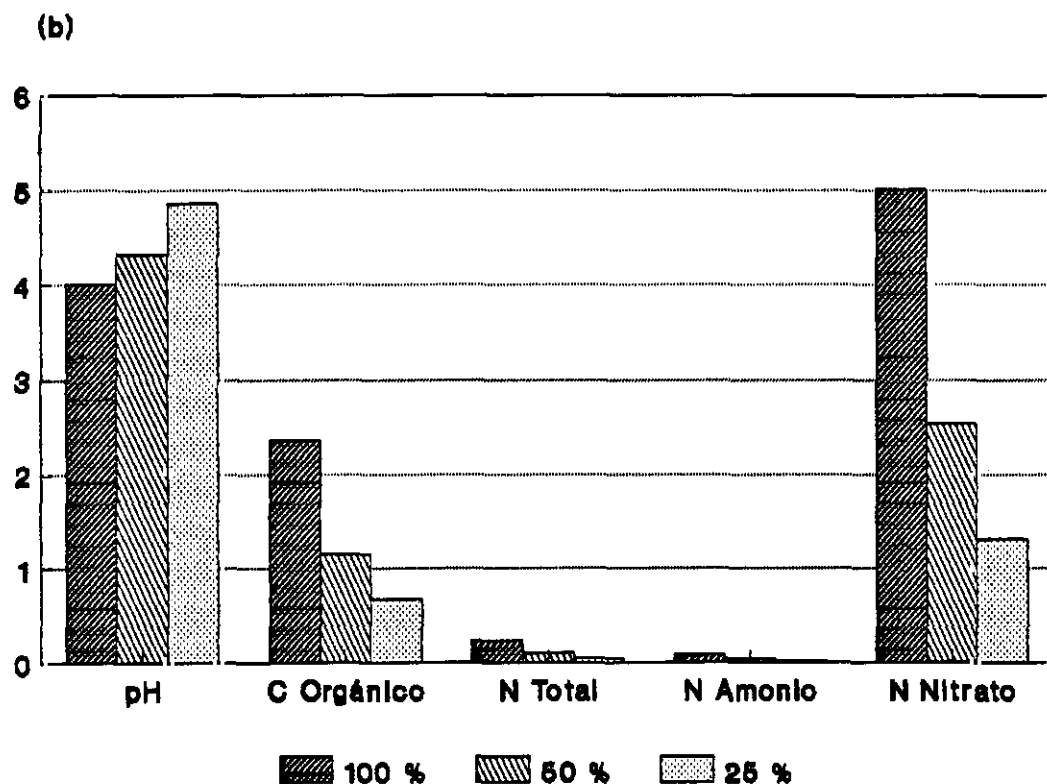
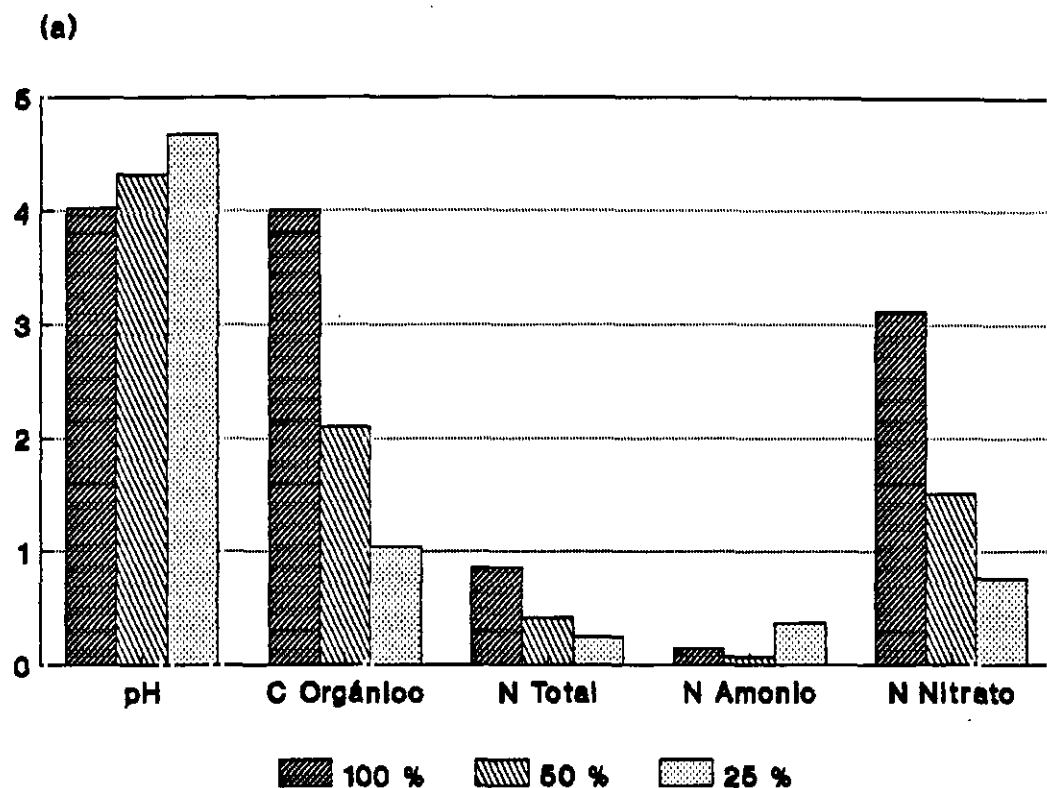


Figura 4.6. Resultados de la caracterización fisicoquímica de los exudados de plantas noduladas (a) y sin nodular (b). Unidades: C orgánico (%); N total (mg N/ ml exudado); N amonio ( $\mu\text{g NH}_4^+/\text{ml} \times 10^{-2}$ ); N nitrato ( $\mu\text{g NO}_3^-/\text{ml}$  exudado). En (a) los resultados de N amonio  $\times 10^{-2}$  y en (b)  $\times 10^{-4}$ .

#### 4.3.2. Caracterización bioquímica

La determinación proteica efectuada por el método de Lowry nos muestra que los exudados de plantas noduladas poseen una concentración (en el caso de los más concentrados, es decir del 100%) de 0.007 g/l mientras que por este método pero sin emplear el reactivo de Folin obtenemos una concentración de 0.0011 g/l. En los exudados de plantas sin nodular por el método de Lowry obtenemos una concentración de poroteínas de 0.005 g/l y por este mismo método pero sin el reactivo de folin los resultados son de 0.009 g/l.

El estudio efectuado sobre la composición de hidratos de carbono (figura 4.7) muestra que los azúcares presentes en los exudados de plantas noduladas y sin nodular son diferentes: maltosa (Rf=29.54), galactosa (40.90), manosa (49.24) y xilosa (53.78) en plantas noduladas y lactosa (18.39), maltosa (29.54), galactosa (40.90) y xilosa (53.78), en plantas sin nodular.

Los resultados del análisis de lípidos presentes en los exudados son los siguientes: las plantas noduladas en las condiciones ensayadas poseen una concentración de 0.047 mg de lípidos por ml de exudado (en el caso de los más concentrados, es decir al 100%) y 0.0022 mg de lípidos por ml de exudado en plantas sin nodular.

El análisis cualitativo de lípidos (figura 4.8) muestra que en ambos tipos de exudados hay tipos diferentes de compuestos, con más variedad en las plantas noduladas que en las plantas sin nodular. Los compuestos detectados, desde el punto de aplicación hacia el frente son: fosfolípidos (1), monoglicéridos (2), diglicéridos (3), esteroides (4), ácidos grasos libres (5), triglicéridos (6) y ésteres de esteroides (7). La diferencia fundamental entre los dos tipos de exudados se encuentra en las bandas de mono y diglicéridos que aparecen en los exudados de las plantas noduladas y no en el otro caso.



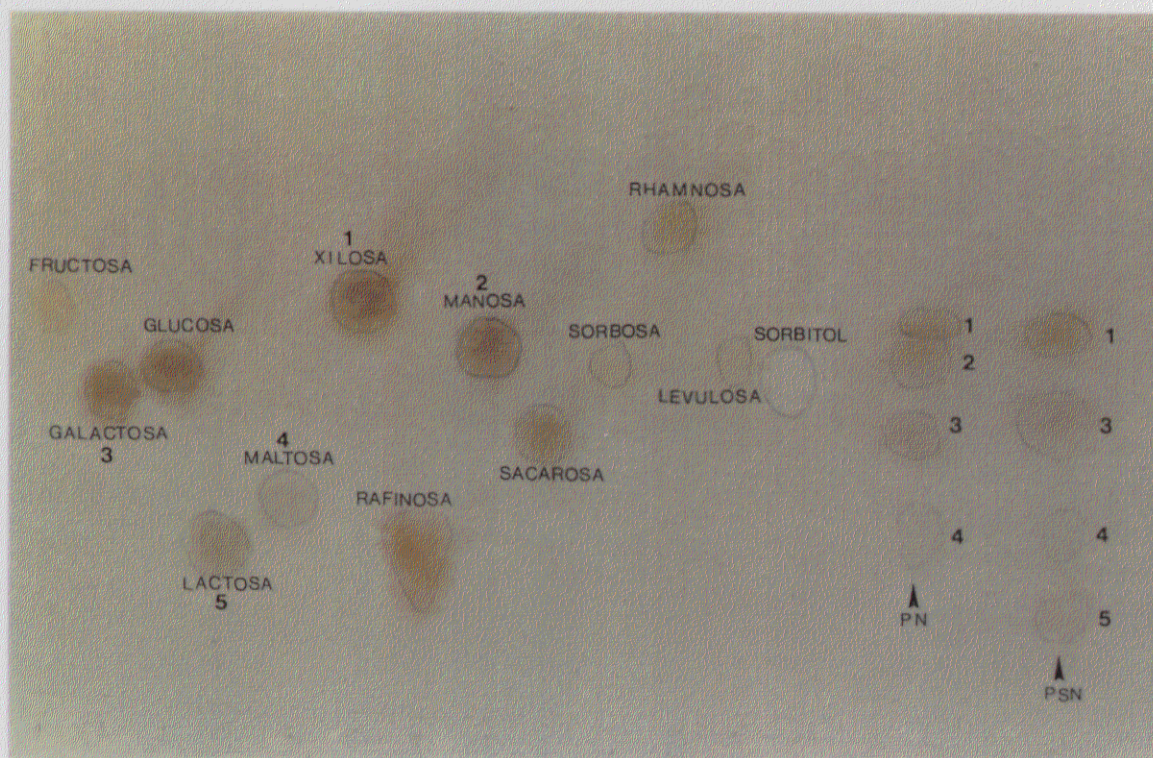


Figura 4.7. Cromatograma de azúcares de los exudados de plantas noduladas (PN) y sin nodular (PSN) con sus respectivos patrones.

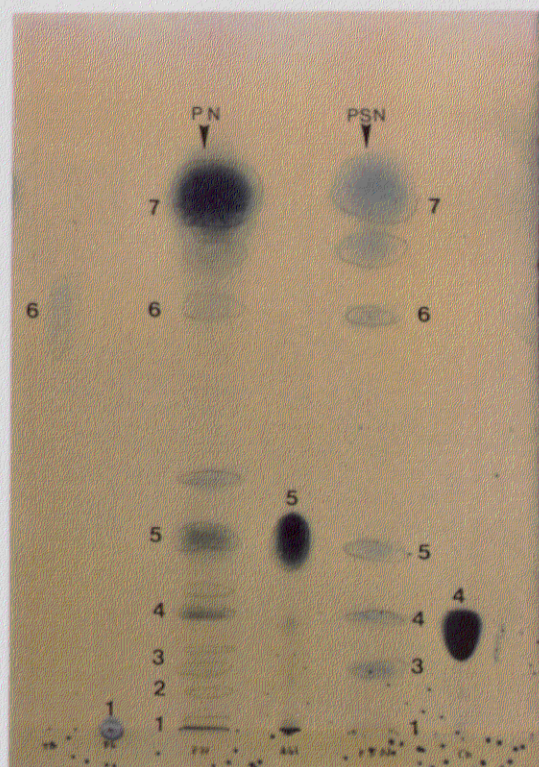


Figura 4.8. Cromatograma de lípidos de los exudados de plantas noduladas (PN) y sin nodular (PSN) con sus respectivos patrones.



#### 4.4. Efecto de los exudados sobre los grupos funcionales del ciclo del nitrógeno

##### 4.4.1. Fijación de nitrógeno potencial (ARA)

##### 4.4.1.1. Efecto de los exudados nodulares y radicales

El ARA detectado en los suelos en presencia de exudados nodulares, radicales y en los controles se expone en la tabla 4.VI y figura 4.9. Los correspondientes ANOVA y LSD de los datos aparecen en las tablas 4.VII., 4.VIII.a y b. Los LSD de las interacciones se muestran en el apéndice B (tabla B.I). El ANOVA indica que hay diferencias significativas entre todas las fuentes de variación: suelos ( $F=91.33$ ,  $p<0.01$ ), tratamientos ( $F=578.64$ ,  $p<0.01$ ), y en la interacción de ambos ( $F=14.21$ ,  $p<0.01$ ).

De los tres suelos ensayados, el C es en el que menor ARA se detecta ( $0.5078 \text{ nmol etileno g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ) y el mayor los suelos D y B ( $0.8868$  y  $0.8845 \text{ nmol etileno g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ , respectivamente). Los únicos suelos que no exhiben diferencias significativas con  $p<0.01$  son el B y D (tabla 4.VIII.b).

Respecto a los tratamientos con los exudados nodulares, encontramos que el mayor ARA (excluyendo los controles) se encuentra en los exudados más concentrados (T1), reduciéndose notablemente en los T2, T3. Este efecto, también se encuentra en los radicales; sin embargo estos últimos no presentan diferencias significativas entre sí (tabla 4.VIII.a).

En el caso de los controles, los que muestran valores de ARA más altos son los que tienen mayor concentración de carbono orgánico o molibdeno. Al comparar los tratamientos y controles cabe destacar que T1N es el único tratamiento que no exhibe diferencias significativas con C+M, pero sí respecto al resto; los otros tratamientos presentan diferencias significativas ( $p<0.01$ ) con todos los controles, salvo el control con agua (Ca).

Los LSD de las interacciones (apéndice B tabla B.I) muestran que, en general las tendencias observadas al estudiar conjuntamente los cuatro suelos se mantiene en cada suelo por separado, a excepción del suelo C debido a la escasa actividad encontrada.

Al considerar tratamientos y controles conjuntamente, destaca un comportamiento semejante de T1R y T1N: a excepción de T1R que no muestra diferencias estadísticas con Ca y T1N que tampoco es diferente de C+M; los tratamientos menos concentrados (T2N, T2R, T3N y T3R) muestran diferencias respecto a todos los controles salvo con Ca.

En las tablas y figuras siguientes las abreviaturas empleadas son: T1, T2 y T3 : tratamientos 1, 2 y 3 (corresponden respectivamente con la aplicación de los exudados nodulares (N) y radicales (R) al 10%, 5% y 2%, sobre los suelos ensayados. También empleamos dichos sufijos en los controles). Ca: control con agua a CRM; C: control con carbono orgánico y agua a CRM; 2C: control con carbono orgánico doble concentración y agua a CRM; C+E: control con carbono orgánico y exudados a CRM. Mo: control con molibdeno y agua a CRM; C+M: control con molibdeno, carbono orgánico y agua a CRM; A, B, C y D son los suelos ensayados. Unidades: nmol C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> /g suelo /hora.

Tabla 4.VI. Resultados del ARA en los suelos A, B, C y D tratados con los exudados nodulares, radicales y en los controles.

	Suelo A	Suelo B	Suelo C	Suelo D
T1N	0.352 ± .045	0.505 ± .155	0.192 ± .034	0.416 ± .006
T2N	0.030 ± .005	0.033 ± .005	0.016 ± .001	0.052 ± .000
T3N	0.056 ± .002	0.049 ± .004	0.030 ± .003	0.046 ± .002
T1R	0.103 ± .002	0.433 ± .003	0.103 ± .000	0.327 ± .002
T2R	0.022 ± .000	0.027 ± .005	0.013 ± .000	0.031 ± .000
T3R	0.025 ± .002	0.031 ± .000	0.005 ± .000	0.026 ± .000
Ca	0.041 ± .000	0.034 ± .002	0.014 ± .000	0.086 ± .049
Mo	0.898 ± .036	0.891 ± .007	0.205 ± .004	0.439 ± .001
CN	0.701 ± .088	0.808 ± .004	0.381 ± .009	0.896 ± .023
2CN	1.383 ± .180	1.501 ± .001	1.326 ± .035	1.471 ± .195
C+EN	2.332 ± .166	2.399 ± .019	2.059 ± .016	2.801 ± .124
C+MN	0.035 ± .007	0.506 ± .012	0.191 ± .007	0.048 ± .021
CR	0.529 ± .007	0.428 ± .043	0.163 ± .004	0.541 ± .001
2CR	1.041 ± .009	1.152 ± .052	0.717 ± .009	1.035 ± .002
C+ER	1.086 ± .004	2.214 ± .009	1.433 ± .015	2.166 ± .002
C+MR	3.054 ± .002	2.721 ± .039	1.273 ± .016	3.441 ± .018

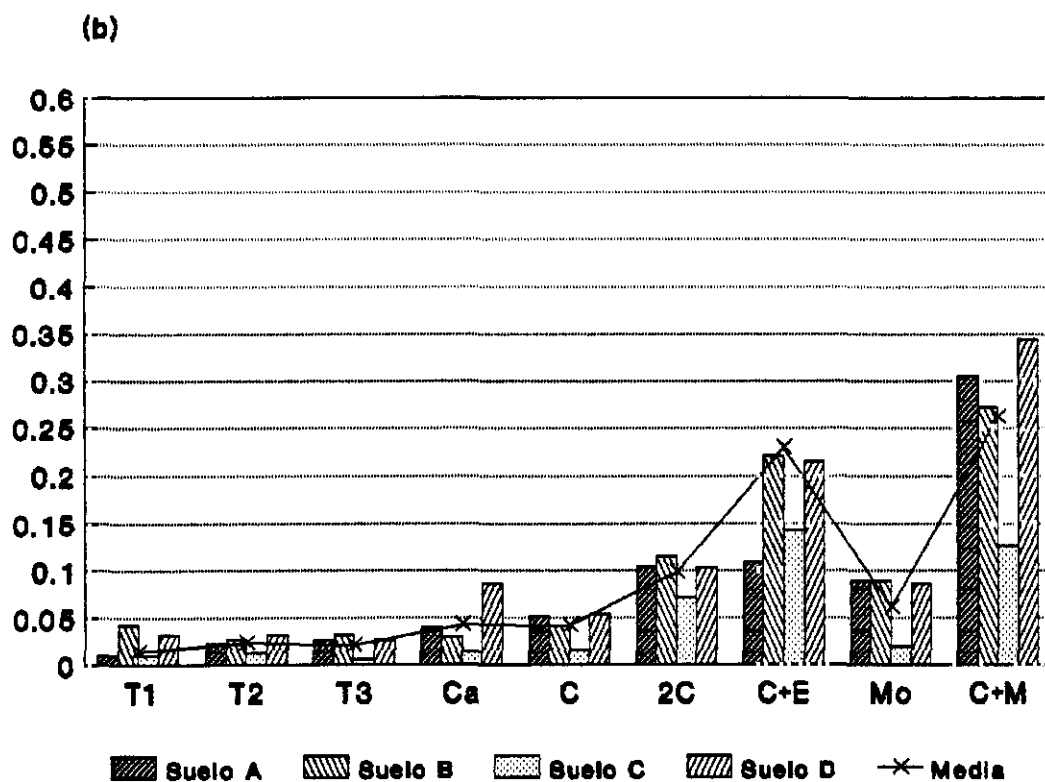
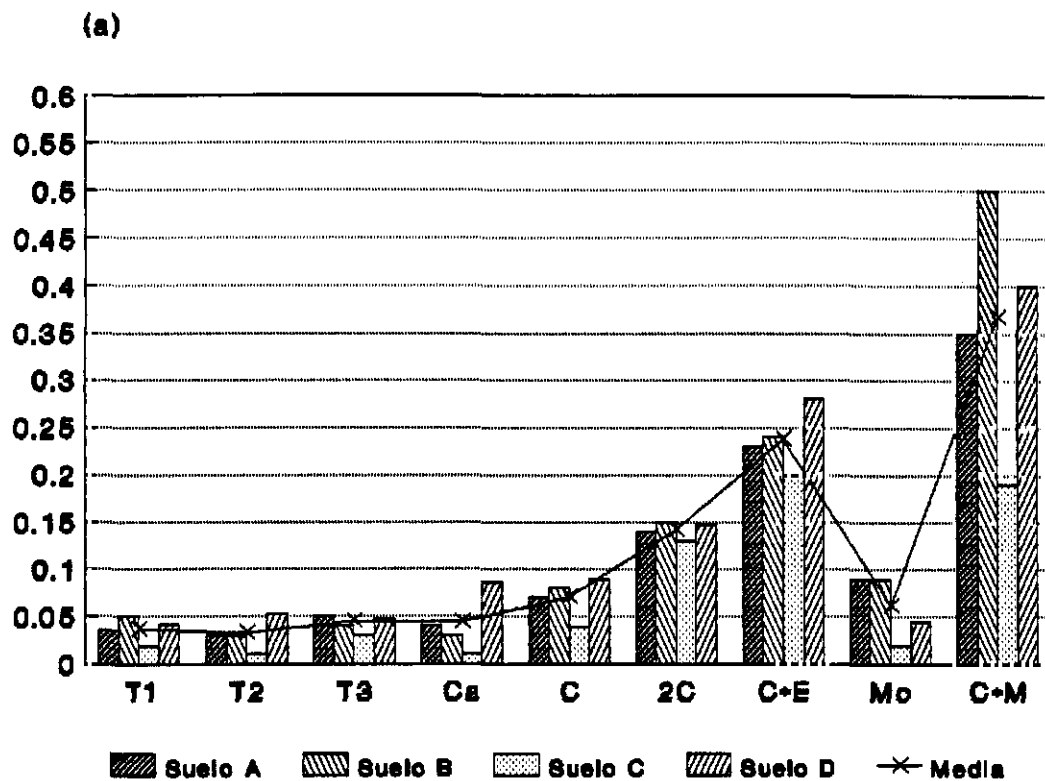


Figura 4.9. Resultados de ARA potencial en los distintos suelos ensayados tratados con exudados nodulares (a) y radicales (b). En (a) T1, C, 2C, Mo y C+E están  $\times 10^{-1}$ . En (b) T1, C, 2C, C+E, Mo y C+M están  $\times 10^{-1}$ .



Tabla 4.VII. Resultados del ANOVA de la fijación de nitrógeno potencial (ARA) con exudados nodulares y radicales.

F. de variación	G.l.	F	p	Significación
Tratamientos y controles	15	578.64	$2.9 \times 10^{-7}$	S.(**)
Suelos	3	91.33	$1.78 \times 10^{-7}$	S.(**)
Interacción	45	14.21	$8.34 \times 10^{-7}$	S.(**)

N.S.= no significativo S.=significativo. \*\* =  $p < 0.01$

Tablas 4.VIII.a y b. LSDs de los tratamientos (a) y suelos (b).

Tratamientos y controles

(a)

#### 4.4.1.2. Efecto de los exudados de plantas noduladas y sin nodular

El ARA detectado en los suelos en presencia de los exudados de plantas noduladas y sin nodular así como en los controles aparece en la tabla 4.IX y se representa en la figura 4.10. Los ANOVAs y LSD aparecen en las tablas 4.X y 4.XI.a y b respectivamente.

En el ANOVA (tabla 4.X) se detectan diferencias significativas entre suelos ( $F=2020.29$ ,  $p<0.01$ ), tratamientos ( $F=1508.223$ ,  $p<0.01$ ), y en la interacción de ambos ( $F=261.66$ ,  $p<0.01$ ), (Véase apéndice B, tabla B.II).

Las tendencias observadas con los distintos exudados son diferentes en el caso de los de las plantas noduladas (PN) y las plantas sin nodular (PSN). En todos los casos se encuentra un incremento del ARA significativo ( $p<0.01$ ) respecto al control Ca. En los ensayos con exudados PN aumenta el ARA al incrementarse la concentración de estos, mientras que en PSN ocurre lo contrario. En los controles de PSN al aumentar la concentración de carbono orgánico dejan de existir diferencias significativas con los tratamientos menos concentrados. Sin embargo, al comparar los tratamientos de PN con los controles todos muestran diferencias estadísticas. Hemos de señalar que se produce una disminución del ARA en el control C+E de PSN de tal forma que no hay diferencias con T1. Todos los suelos presentaron ARAs diferentes ( $p<0.01$ ) siendo este en orden creciente  $B > D > A > C$ .

Los cuatro suelos, por separado muestran las mismas tendencias señaladas anteriormente. Solo en el suelo C tanto los exudados PN como PSN no muestran diferencias, mientras que el resto al menos difieren entre los exudados de concentración menor y mayor (T1 y T3). En los tratamientos con exudados PN la mayor parte de no significaciones con los controles se dan entre T2 y T3; hay que señalar que el suelo C es el único en el que todos los tratamientos (PN y PSN) no difieren estadísticamente del control Ca ni de los dos controles de Crone (CN y SN).

En las tablas y figuras siguientes las abreviaturas empleadas son: T1, T2 y T3 : tratamientos 1, 2 y 3 (corresponden respectivamente con la aplicación de los exudados de plantas noduladas (PN) y sin nodular (PSN) al 100%, 50% y 25%, sobre los suelos ensayados. También empleamos dichos sufixos en los controles). Ca: control con agua a CRM; C: control con carbono orgánico y agua a CRM; 2C: control con carbono orgánico doble concentración y agua a CRM; C+E: control con carbono orgánico y exudados a CRM. Mo: control con molibdeno y agua a CRM; C+M: control con molibdeno, carbono orgánico y agua a CRM; CN: control con Cronre+N; SN: control con Crone-N; A, B, C y D son los suelos ensayados Unidades: nmol C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> /g suelo /hora.

Tabla 4.IX. Resultados del ARA en los suelos A, B, C y D tratados con los exudados de plantas noduladas, sin nodular y los respectivos controles.

	Suelo A	Suelo B	Suelo C	Suelo D
T1PN	0.466 ± .006	1.005 ± .002	0.121 ± .000	0.576 ± .005
T2PN	0.230 ± .004	0.575 ± .025	0.053 ± .001	0.093 ± .002
T3PN	0.131 ± .005	0.331 ± .004	0.032 ± .001	0.042 ± .002
T1PSN	0.063 ± .000	0.102 ± .000	0.031 ± .000	0.064 ± .000
T2PSN	0.112 ± .010	0.235 ± .012	0.062 ± .000	0.133 ± .000
T3PSN	0.235 ± .000	0.562 ± .023	0.123 ± .000	0.252 ± .011
Ca	0.004 ± .000	0.015 ± .002	0.015 ± .002	0.011 ± .000
Mo	0.818 ± .009	1.842 ± .080	0.211 ± .004	1.311 ± .014
SN	0.093 ± .004	0.022 ± .011	0.021 ± .001	0.022 ± .000
CN	0.021 ± .000	0.010 ± .000	0.001 ± .000	0.003 ± .000
CPN	0.451 ± .008	1.023 ± .004	0.112 ± .000	0.828 ± .014
2CPN	0.857 ± .058	1.989 ± .005	0.291 ± .002	1.541 ± .024
C+EPN	0.978 ± .021	2.942 ± .056	0.154 ± .000	3.134 ± .060
C+MPN	1.229 ± .036	3.374 ± .011	0.412 ± .008	4.733 ± .178
CPSN	0.103 ± .000	0.193 ± .005	0.061 ± .004	0.142 ± .015
2CPSN	0.192 ± .005	0.403 ± .009	0.133 ± .005	0.263 ± .004
C+EPSN	0.083 ± .001	0.192 ± .003	0.043 ± .002	0.974 ± .002
C+MPSN	0.831 ± .004	1.762 ± .004	0.621 ± .001	0.936 ± .004

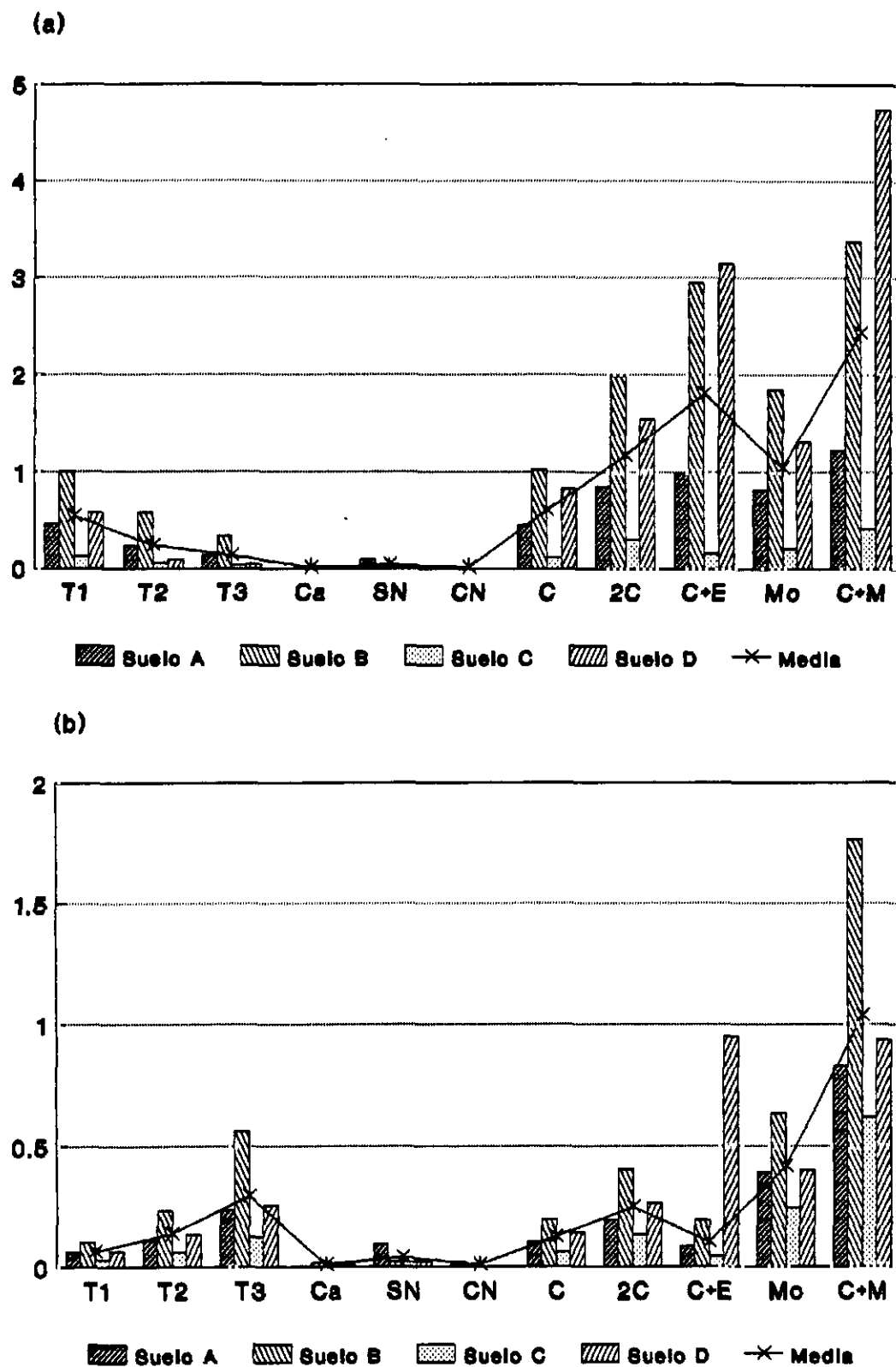


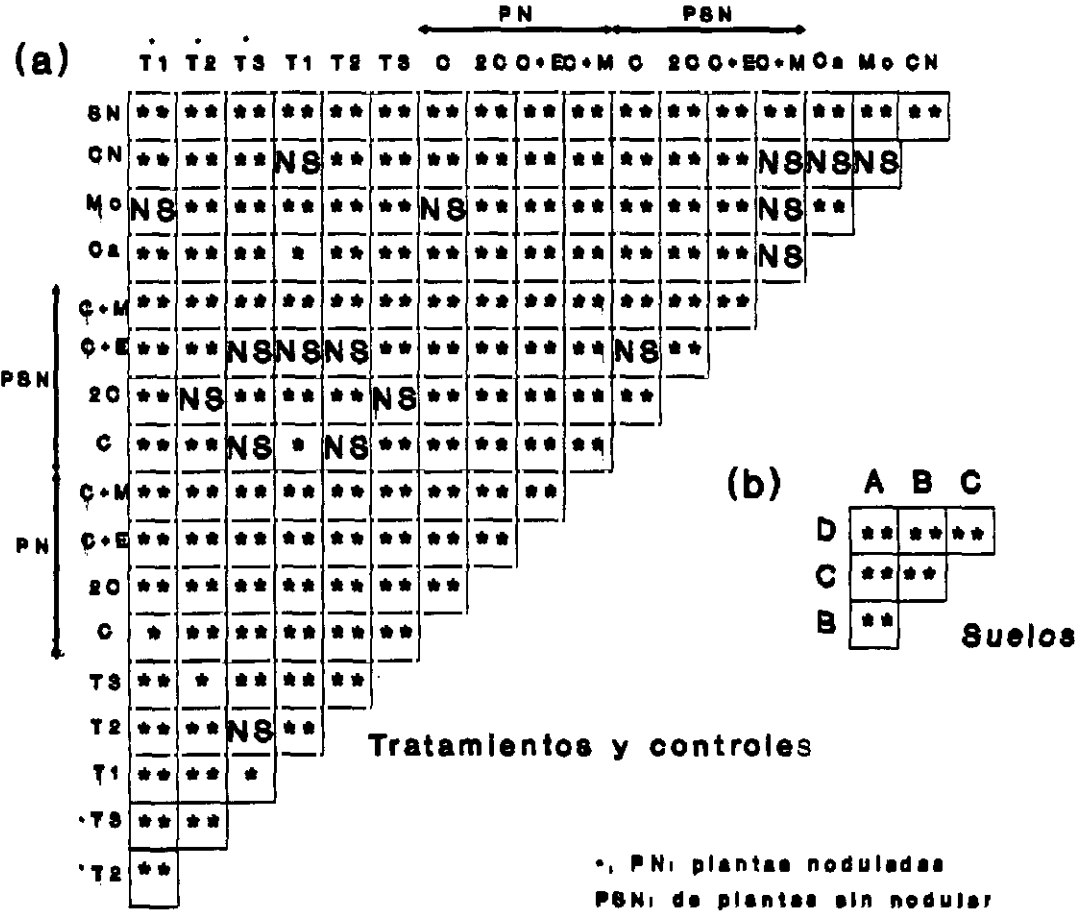
Figura 4.10. Resultados de ARA potencial en los distintos suelos ensayados, tratados con exudados de plantas noduladas (a) y sin nodular (b).

Tabla 4.X. Resultados del ANOVA de la fijación de nitrógeno potencial (ARA) con exudados de plantas noduladas y sin nodular.

F. de variación	G.l.	F	p	Significación
Tratamientos y controles	17	1508.22	$4.76 \times 10^{-7}$	S.(**)
Suelos	3	2020.29	$5.96 \times 10^{-8}$	S.(**)
Interacción	51	261.66	$9.53 \times 10^{-7}$	S.(**)

N.S.= no significativo S.=significativo. \*\* =  $p<0.01$

Tablas 4.XI.a y b. LSDs de los tratamientos (a) y suelos (b).



#### 4.4.2. Mineralización potencial

##### 4.4.2.1. Efecto de los exudados nodulares y radicales

Los resultados se muestran en la tabla 4.XII y se representan en la figura 4.11. El análisis de la varianza (tabla 4.XIII), muestra que hay diferencias significativas entre suelos ( $F=14.582$ ,  $p<0.01$ ), tratamientos y controles ( $F=4.988$ ,  $p<0.01$ ), así como en la interacción ( $F=1.683$ ,  $p<0.01$ ), (véase Apéndice B, tabla B.III)

El LSD (tabla 4.XIV.a y b) nos indica que el suelo B (con mayor tasa de amonificación,  $0.0638 \text{ día}^{-1}$ ) es el unico que es significativamente distinto del resto.

Por otra parte, los tratamientos más concentrados (T1N y T1R) muestran tasas de amonificación ( $0.0398$  y  $0.0283 \text{ día}^{-1}$  respectivamente) de aproximadamente la mitad que los restantes (en torno a  $0.06$  en nodulares y  $0.05$  en radicales). Al comparar los tratamientos el LSD indica que los más concentrados, tanto nodulares como radicales presentan tasas significativamente iguales, siendo significativamente distintos por un lado T1N respecto a T2N y T3N y por otro T1R respecto a T2R y T3R.

Los dos controles con asparagina (CAR y CAN) presentan valores algo mayores que los respectivos tratamientos T1 y no son distintos, pero si lo son respecto al control con agua (Ca). Los tratamientos T1N y T1R son estadísticamente iguales a los respectivos controles pero diferentes a Ca; el resto de los tratamientos son diferentes significativamente a los controles.

En la interacción encontramos las mismas tendencias descritas al considerar los suelos en conjunto (apéndice B, tabla B.III).

En las tablas y figuras siguientes las abreviaturas empleadas son: T1, T2 y T3 : tratamientos 1, 2 y 3 (corresponden respectivamente con la aplicación de los exudados nodulares (N) y radicales (R) al 10%, 5% y 2%, sobre los suelos ensayados. También empleamos dichos sufijos en los controles). Ca: control con agua a CRM; CAS: control con nitrógeno mineralizable (Aan) y agua a CRM. A, B, C y D son los suelos ensayados. Unidades:  $\text{Días}^{-1}$ .

Tabla 4.XII. Resultados de la mineralización potencial en los suelos A, B, C y D tratados con los exudados nodulares, radicales y controles.

	Suelo A	Suelo B	Suelo C	Suelo D
T1N	0.0321 ± .0051	0.0429 ± .0050	0.0290 ± .0010	0.0520 ± .0010
T2N	0.0931 ± .0190	0.0582 ± .0120	0.0580 ± .0040	0.0610 ± .0020
T3N	0.0522 ± .0020	0.0394 ± .0032	0.0774 ± .0053	0.0590 ± .0030
T1R	0.0208 ± .0004	0.0232 ± .0001	0.0172 ± .0004	0.0420 ± .0001
T2R	0.0815 ± .0051	0.0473 ± .0005	0.0494 ± .0003	0.0507 ± .0020
T3R	0.0717 ± .0046	0.0288 ± .0007	0.0678 ± .0001	0.0490 ± .0001
CASN	0.0845 ± .0091	0.0254 ± .0010	0.0325 ± .0010	0.0293 ± .0040
CASR	0.0738 ± .0004	0.0154 ± .0022	0.0220 ± .0006	0.0196 ± .0001
Ca	0.0885 ± .0040	0.0722 ± .0150	0.0595 ± .0053	0.0354 ± .0020

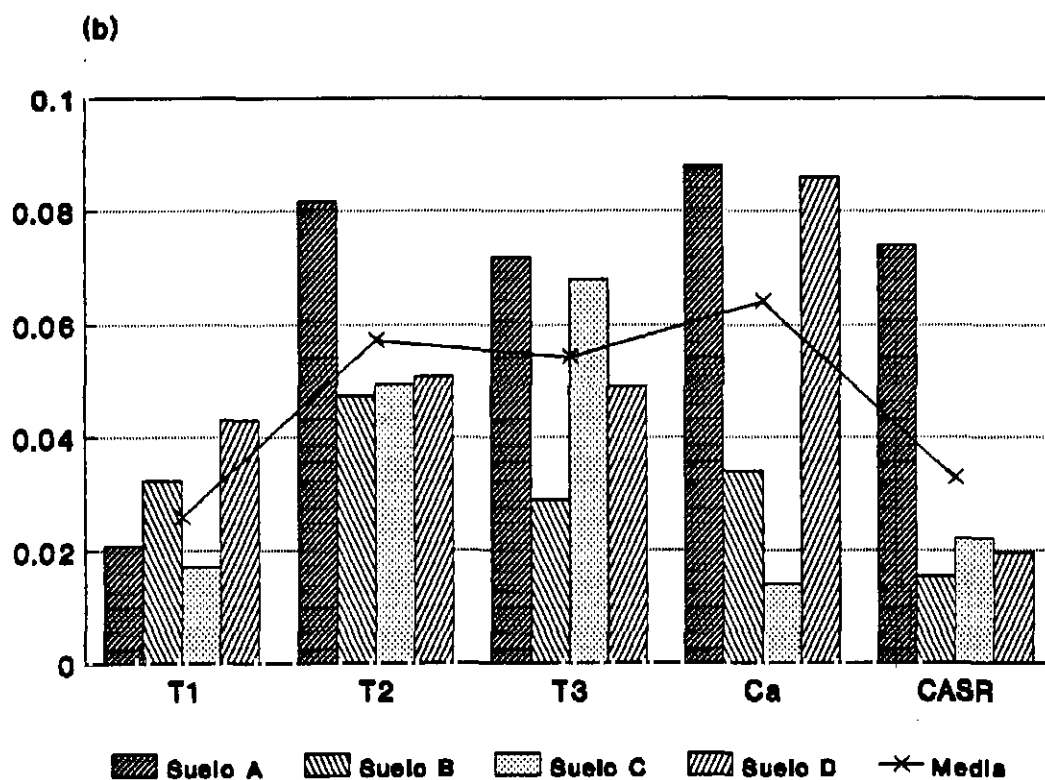
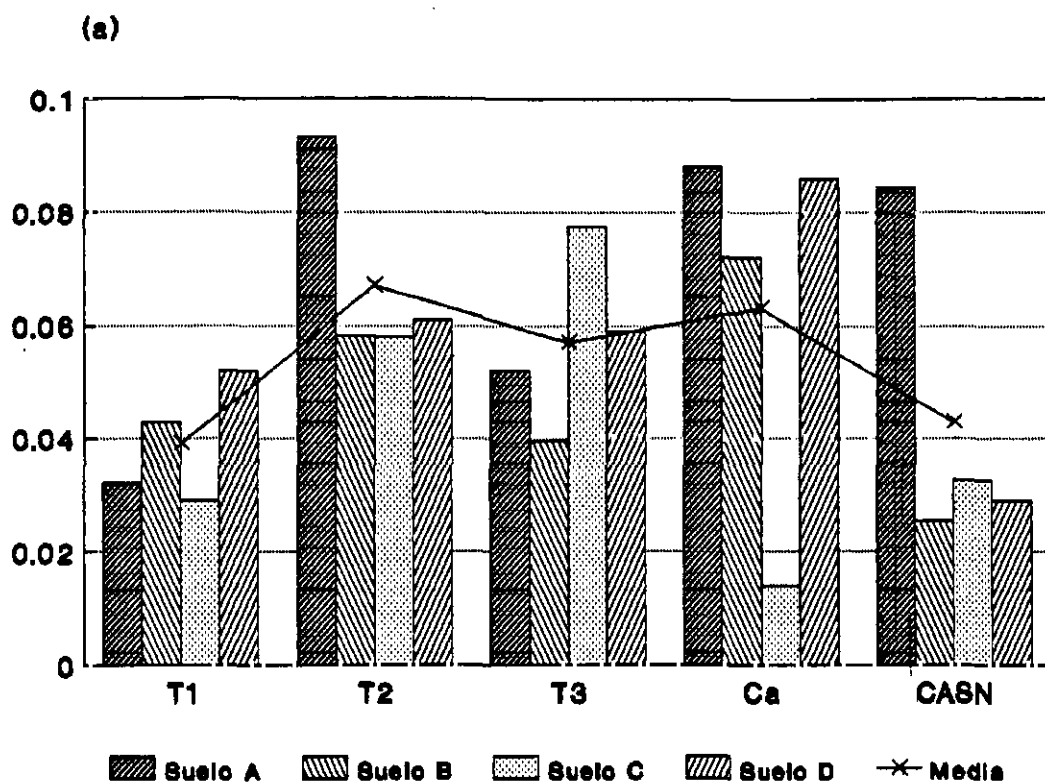


Figura 4.11. Resultados del potencial de mineralización en presencia de exudados nodulares (a) y radicales (b).



Tabla 4.XIII. Resultados del ANOVA de la mineralización potencial con exudados nodulares y radicales.

F. de variación	G.l.	F	p	Significación
Tratamientos y controles	8	4.98	$6.15 \times 10^{-5}$	S.(**)
Suelos	3	14.58	$1.78 \times 10^{-7}$	S.(**)
Interacción	24	1.68	$1.68 \times 10^{-2}$	S.(**)

N.S.= no significativo    S.=significativo.    \*\* = $p<0.01$

Tablas 4.XIV.a y b. LSDs de los tratamientos (a) y suelos (b).

# Tratamientos y controles

(a)

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	CA	CAR
CA	**	NS	NS	**	NS	NS	*	**		
CAR	NS	**	**	NS	**	*	NS			
CAN	NS	**	*	NS	NS	NS				
T3R	NS	NS	NS	**	NS					
T2R	*	NS	NS	**						
T1R	NS	**	**							
T5N	*	NS								
T2N	**									

(b)

Suelos				
	A	B	C	
D	NS	**	NS	
C	NS	**		
B	**			

#### 4.4.2.2. Efecto de los exudados de plantas noduladas y sin nodular

Los resultados se muestran en la tabla 4.XV y se representan en la figura 4.12. El análisis de la varianza (tabla 4.XVI), indica que no hay diferencias significativas entre suelos ( $F=0.9994$ ,  $p=0.3970$ ), ni entre tratamientos y controles ( $F=1.0011$ ,  $p=0.4489$ ), tampoco es significativa la interacción ( $F=0.9999$ ,  $p=0.4804$ ).

Pese a no existir diferencias significativas en ninguno de los casos hay que destacar la tendencia al aumento de la amonificación potencial al aumentar las concentraciones de exudados, tanto en PN como en PSN. Estas tendencias se observan en cada uno de los suelos ensayados.

---

En las tablas y figuras siguientes las abreviaturas empleadas son: T1, T2 y T3 : tratamientos 1, 2 y 3 (corresponden respectivamente con la aplicación de los exudados de plantas noduladas (PN) y sin nodular (PSN) al 100%, 50% y 25%, sobre los suelos ensayados. También se emplean dichos sufijos en los controles). Ca: control con agua a CRM; CAS: control con nitrógeno mineralizable (Aan) y agua a CRM. SN: control Crone-N. CN: control Crone+N. A, B, C y D son los suelos ensayados. Unidades:  $\text{Días}^{-1}$ .

---

Tabla 4.XV. Resultados de la mineralización potencial en los suelos A, B, C y D tratados con los exudados de plantas noduladas, no noduladas y controles.

	Suelo A	Suelo B	Suelo C	Suelo D
T1PN	0.4223 $\pm$ .0090	0.4254 $\pm$ .0044	0.2122 $\pm$ .0051	0.7631 $\pm$ .0039
T2PN	0.2212 $\pm$ .0041	0.2227 $\pm$ .0053	0.1017 $\pm$ .0009	0.3567 $\pm$ .0007
T3PN	0.1121 $\pm$ .0037	0.1042 $\pm$ .0043	0.0535 $\pm$ .0035	0.1772 $\pm$ .0048
T1PSN	0.3106 $\pm$ .0123	0.3201 $\pm$ .0081	0.1031 $\pm$ .0099	0.6621 $\pm$ .0251
T2PSN	0.1621 $\pm$ .0096	0.1722 $\pm$ .0098	0.0542 $\pm$ .0031	0.3995 $\pm$ .0094
T3PSN	0.0812 $\pm$ .0013	0.0883 $\pm$ .0013	0.0300 $\pm$ .0013	0.1671 $\pm$ .0032
CASPN	0.3936 $\pm$ .0053	0.3120 $\pm$ .0419	0.2010 $\pm$ .0021	0.6624 $\pm$ .0134
CASPSN	0.2912 $\pm$ .0182	0.3022 $\pm$ .0043	0.1121 $\pm$ .0086	0.6431 $\pm$ .0164
Ca	0.0618 $\pm$ .0042	0.0642 $\pm$ .0026	0.0323 $\pm$ .0016	0.0920 $\pm$ .0051
CN	0.0013 $\pm$ .0000	0.0020 $\pm$ .0002	0.0003 $\pm$ .0000	0.0009 $\pm$ .0000
SN	0.0763 $\pm$ .0006	0.0647 $\pm$ .0021	0.0376 $\pm$ .0016	0.1040 $\pm$ .0033

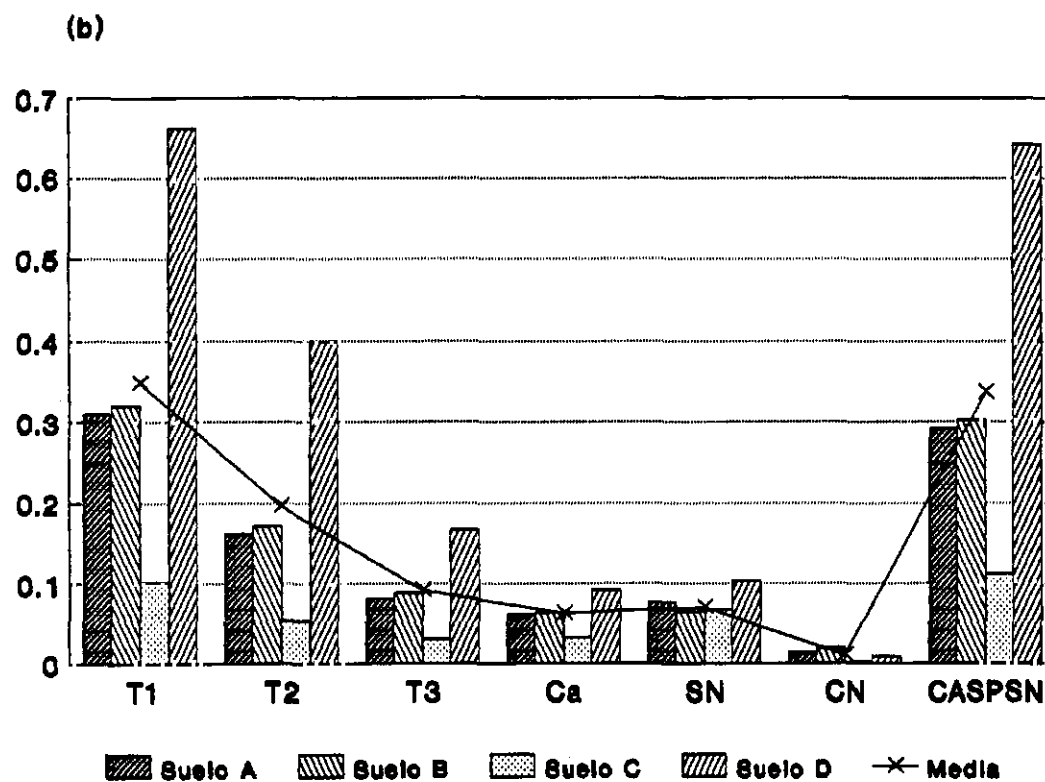
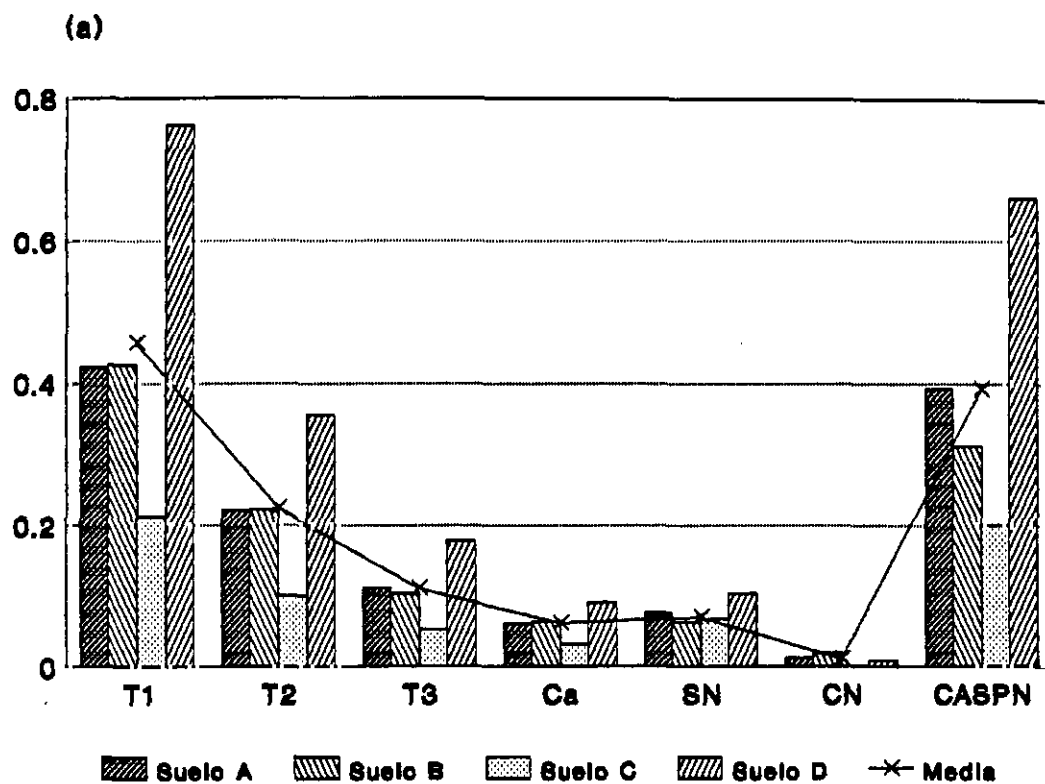


Figura 4.12. Resultados del potencial de mineralización en presencia de exudados de plantas noduladas (a) y sin nodular (b). En ambos casos CN va multiplicado x10.

Tabla 4.XVI. Resultados del ANOVA de la mineralización potencial con exudados de plantas noduladas y sin nodular.

F. de variación	G.l.	F	p	Significación
Tratamientos y controles	10	1.001	0.4489	N.S.
Suelos	3	0.999	0.3970	N.S.
Interacción	30	0.999	0.4804	N.S.

N.S.= no significativo S.=significativo. \*\* = $p<0.01$

#### 4.4.3. Nitrificación potencial

##### 4.4.3.1. Efecto de los exudados nodulares y radicales

Los resultados del potencial nitrificante se muestran en la tabla 4.XVII y se representan en la figura 4.13. El ANOVA y los LSD (Tablas 4.XVIII y 4.XIX.a y b) sólo se han realizado con los datos obtenidos de los suelos A, B y D. El suelo C exhibía valores tan bajos, que de incluirlo en el ANOVA con los demás, daría lugar a que uno de los condicionantes del test, homocedasticidad de varianzas, no se cumpliera y por ello no fuese aplicable.

El ANOVA indica que hay diferencias significativas entre suelos ( $F=250.89$ ,  $p<0.01$ ), los tratamientos y controles muestran diferencias ( $F=81.93$ ,  $p<0.01$ ) así como la interacción ( $F=24.14$ ,  $p<0.01$ ), (véase apéndice B, tabla B.IV).

En los suelos tratados con exudados nodulares, los potenciales más elevados se obtienen con los tratamientos más concentrados, siendo estos diferentes significativamente. El control CNN es el que da lugar a un mayor potencial nitrificante, no presentando diferencias significativas con T1N, el menor potencial se detecta en el control Ca. En el caso de los exudados radicales el control CNR es menor que los tratamientos pero no que el Ca. Los tratamientos radicales no presentan diferencias entre si. Por otra parte también se encuentran diferencias entre los tratamientos nodulares y radicales.

Al considerar los suelos por separado, las tendencias son semejantes a las descritas anteriormente (apéndice B, tabla B.IV). Solo hemos de mencionar que las diferencias entre tratamientos y controles son menos acusadas en el suelo B.

---

En las tablas y figuras siguientes las abreviaturas empleadas son: T1, T2 y T3 : tratamientos 1, 2 y 3 (corresponden respectivamente con la aplicación de exudados nodulares (N) y radicales (R) al 10%, 5% y 2%, sobre los suelos ensayados. También se emplean dichos sufijos para los controles). Ca: control con agua a CRM; CN: control con nitrógeno amonio y agua a CRM. A, B, C y D son los suelos ensayados. Unidades: ppm de nitrato producidas tras 20 días de incubación.

---

Tabla 4.XVII. Resultados de la nitrificación potencial en los suelos A, B, C y D tratados con exudados nodulares, radicales y en los controles.

	Suelo A	Suelo B	Suelo C	Suelo D
T1N	0.3700 ± .0300	0.1800 ± .0100	0.0035 ± .0014	0.7940 ± .0160
T2N	0.2500 ± .0160	0.2100 ± .0490	-0.0180 ± .0048	0.6600 ± .0220
T3N	0.1400 ± .0130	0.2600 ± .0440	-0.0050 ± .0017	0.5030 ± .0340
T1R	0.1500 ± .0094	0.0920 ± .0044	0.0001 ± .0049	0.3310 ± .0148
T2R	0.1230 ± .0027	0.1110 ± .0049	0.0000 ± .0000	0.2520 ± .0018
T3R	0.0700 ± .0049	0.1330 ± .0577	0.0000 ± .0000	0.0510 ± .0014
CNN	0.3700 ± .0360	0.1700 ± .0480	0.0040 ± .0011	0.7770 ± .0170
CNR	0.1650 ± .0029	0.0780 ± .0017	0.0001 ± .0000	0.0440 ± .0023
Ca	0.0456 ± .0040	0.1123 ± .0190	0.0000 ± .0000	0.0838 ± .0076

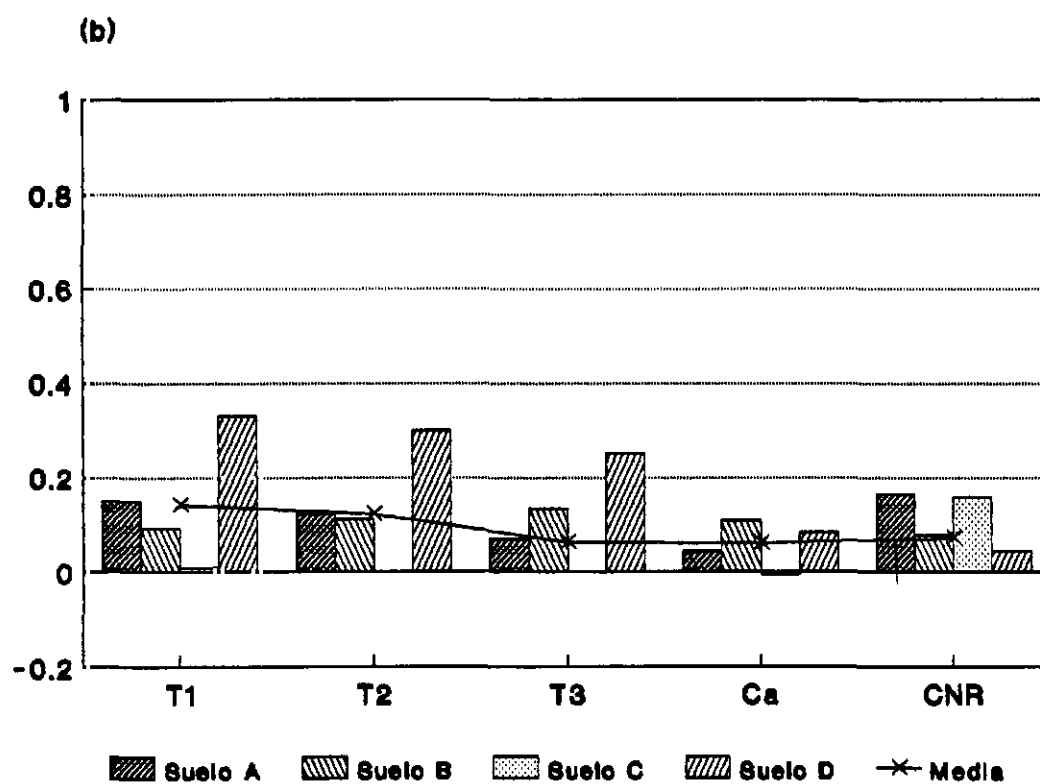
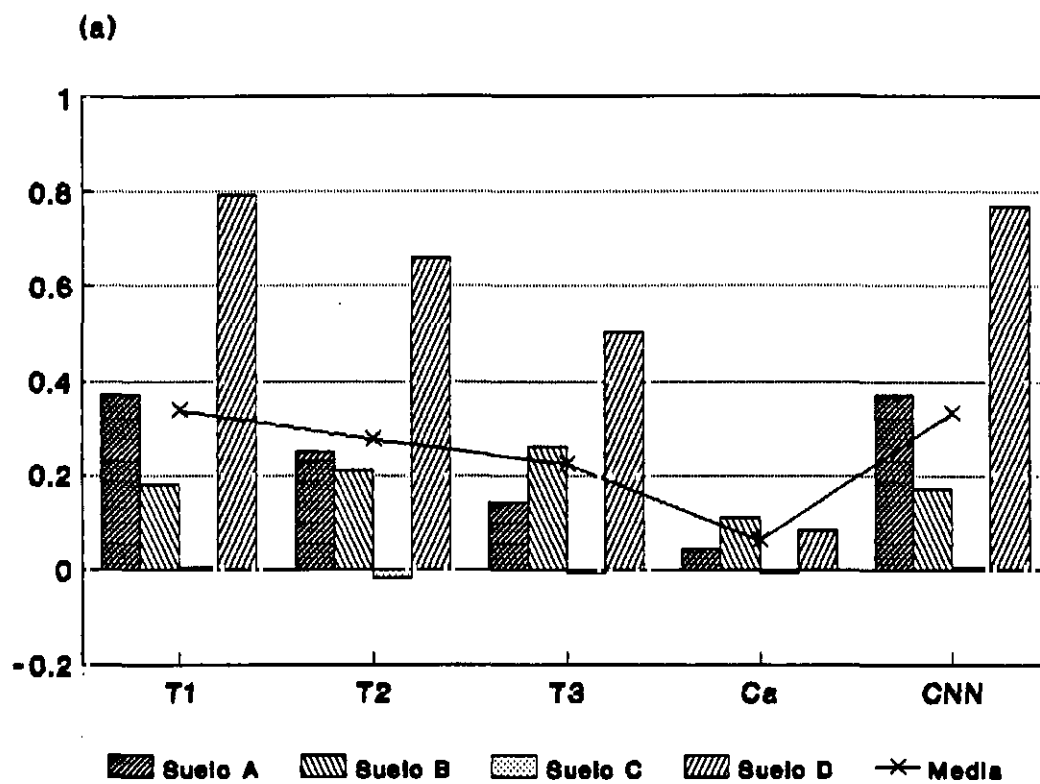


Figura 4.13. Resultados de nitrificación potencial en presencia de exudados nodulares (a) y radicales (b) en los distintos suelos ensayados.

Tabla 4.XVIII. Resultados del ANOVA del potencial de nitrificante de los distintos suelos ensayados con exudados nodulares y radicales.

F. de variación	G.l.	F	P	Significación
Tratamientos y controles	8	81.93	$< 10^{-7}$	S.(**)
Suelos	2	250.89	$< 10^{-7}$	S.(**)
Interacción	16	24.14	$< 10^{-7}$	S.(**)

N.S.= no significativo    S.=significativo. \*\* = $p<0.01$

Tablas 4.XIX.a y b. Resultados de los LSDs en tratamientos (a) y suelos (b) del potencial nitificante.

Tratamientos y controles

(a)

	T1N	T2N	T3N	T1R	T2R	T3R	ONN	ONR
CA	**	**	**	**	**	**	**	NS
ONR	**	**	**	**	**	**	**	
ONN	NS	**	**	**	**	**	**	
T3R	**	**	**	NS	NS			
T2R	**	**	**	NS				
T1R	**	**	**					
T3N	**	**						
T2N	**							

(b)

Suelos

	A	B
D	**	**
B	**	

#### 4.4.3.2. Efectos de exudados de plantas noduladas y sin nodular

Los resultados del potencial nitrificante se muestran en la tabla 4.XX y se representan en la figura 4.14. El ANOVA y los LSD (Tablas 4.XXI y 4.XXII.a y b) sólo se han realizado con los datos obtenidos de los suelos A, B y D. El suelo C no se incluyó por las razones expuestas en el párrafo anterior.

El ANOVA indica que en los tres suelos se obtienen potenciales estadísticamente distintos ( $F=916.58$ ,  $p<0.01$ ), así como en los tratamientos y controles ( $F=150.60$ ,  $p<0.01$ ) y la interacción ( $F=29.69$ ,  $p<0.01$ ), (véase apéndice B, tabla B.V).

Tanto en el caso de los tratamientos con exudados de plantas noduladas (PN) como de plantas sin nodular (PSN), se aprecia un incremento estadísticamente significativo del potencial de nitrificación con la aplicación de los exudados. En ambos casos los distintos tratamientos son significativamente distintos entre sí y respecto a los controles. Los controles Ca, crone sin nitrógeno (SN) y crone con nitrógeno (CN), son los que muestran una menor tasa nitrificante y además no son significativamente distintos entre sí. El tratamiento menos concentrado (T3) de PN, tampoco es diferente de los controles.

Los efectos descritos al considerar los suelos A, B y D en conjunto, son semejantes a los detectados en los suelos por separado, tal y como reflejan los LSD (apéndice B, tabla B.V).



En las tablas y figuras siguientes las abreviaturas empleadas son: T1, T2 y T3 : tratamientos 1, 2 y 3 (corresponden respectivamente con la aplicación de exudados de plantas noduladas (\*, PN) y sin nodular (PSN) al 100%, 50% y 25%, sobre los suelos ensayados. También se emplean dichos sufijos en los controles). Ca: control con agua a CRM; Cn: control con nitrógeno amonio y agua a CRM. CN: Control Crone +N. SN: Control Crone-N. A, B, C y D son los suelos ensayados. Unidades: ppm de nitrato producidas tras 20 días de incubación.

Tabla 4.XX. Resultados de la nitrificación potencial en los suelos A, B, C y D tratados con exudados de plantas noduladas, sin nodular y en los controles.

	Suelo A	Suelo B	Suelo C	Suelo D
T1PN	0.3133 ± .0072	0.2000 ± .0047	0.2300 ± .0271	0.9300 ± .0355
T2PN	0.2300 ± .0380	0.1000 ± .0047	0.0133 ± .0272	0.7400 ± .0241
T3PN	0.0300 ± .0047	0.0630 ± .0240	0.0000 ± .0000	0.6200 ± .0420
T1PSN	0.4123 ± .0109	0.3102 ± .0059	0.3012 ± .0059	0.9501 ± .0254
T2PSN	0.2191 ± .0223	0.1501 ± .0160	0.1501 ± .0082	0.4602 ± .0252
T3PSN	0.1010 ± .0057	0.0721 ± .0132	0.0761 ± .0058	0.2200 ± .0131
CnPN	0.0800 ± .0047	0.0630 ± .0027	0.0030 ± .0012	0.5160 ± .0195
CnPSN	0.0002 ± .0000	0.0010 ± .0000	0.0031 ± .0004	0.5290 ± .0511
Ca	0.0096 ± .0002	0.0200 ± .0047	0.0000 ± .0000	0.1300 ± .0212
CN	0.0010 ± .0004	0.0030 ± .0004	0.0001 ± .0000	0.1460 ± .0131
SN	0.0130 ± .0027	0.0230 ± .0054	0.0000 ± .0000	0.1460 ± .0195

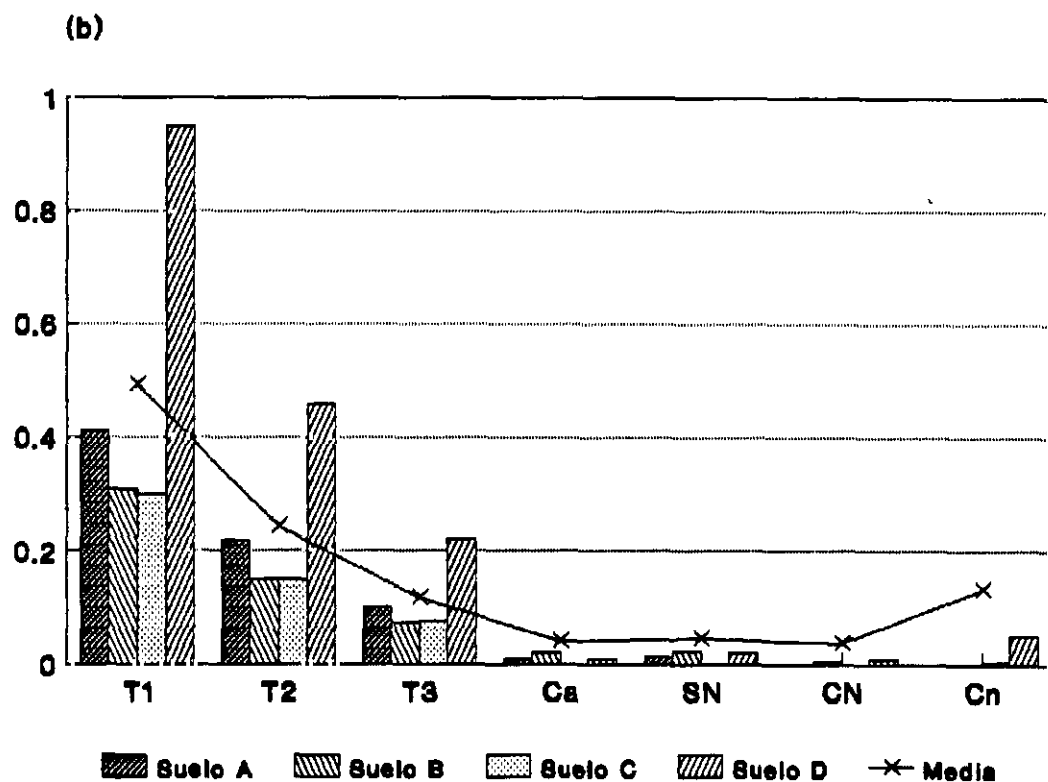
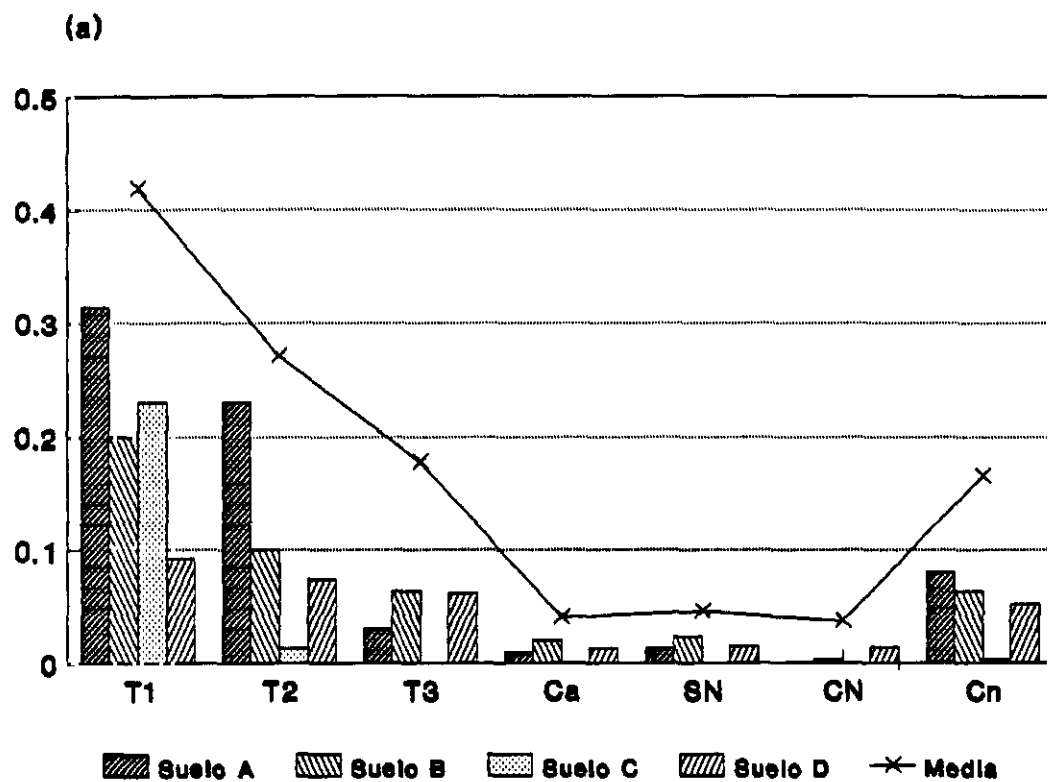


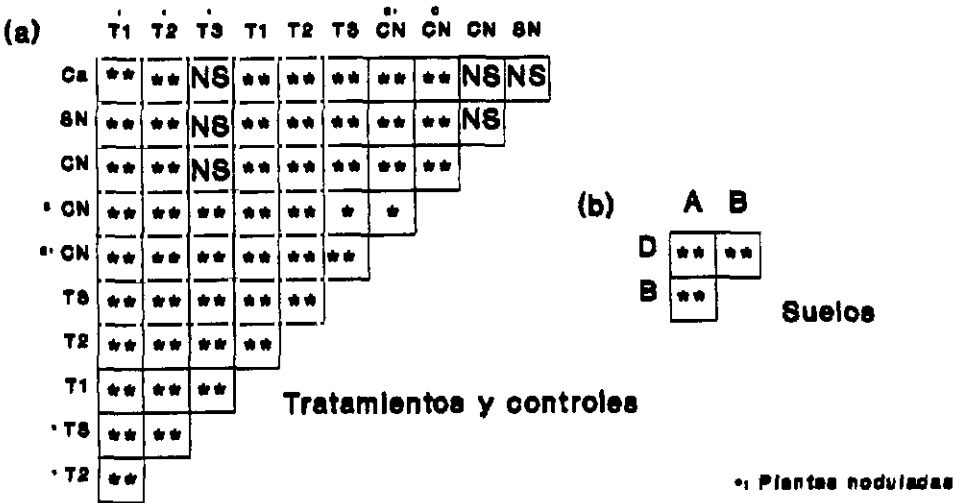
Figura 4.14. Resultados de nitrificación potencial en presencia de exudados de plantas noduladas (a) y sin nodular (b) en los distintos suelos ensayados. Los datos del suelo D van  $\times 10^{-1}$ , salvo en la media.

Tabla 4.XXI. Resultados del ANOVA del potencial de nitrificación en los suelos A, B, C y D tratados con exudados totales de plantas noduladas, sin nodular y en los controles.

F. de variación	G.l.	F	p	Significación
Tratamientos y controles	10	150.60	< 10 <sup>-7</sup>	S.(**)
Suelos	2	916.58	< 10 <sup>-7</sup>	S.(**)
Interacción	20	29.69	< 10 <sup>-7</sup>	S.(**)

N.S.= no significativo    S.=significativo. \*\* =p<0.01

Tablas 4.XXI.a y b. Resultados de los LSDs en tratamientos (a) y suelos (b) del potencial nirtificante.



#### 4.4.4. Desnitrificación potencial total

##### 4.4.4.1. Efecto de los exudados nodulares y radicales

En la desnitrificación (tabla 4.XXIII y figura 4.15), el ANOVA (tabla 4.XXIV) nos indica diferencias significativas entre suelos ( $F=229.47$ ,  $p<0.01$ ), tratamientos ( $F=102.21$ ,  $p<0.01$ ) y en la interacción de ambos factores ( $F=7.77$ ,  $p<0.01$ ), (véase apéndice B, tabla B.VI).

De los cuatro suelos ensayados, la tasa de desnitrificación es más intensa en el A ( $9.162 \text{ nmol N}_2\text{O g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ ), seguido de B y D. El suelo C tiene una actividad desnitrificante ostensiblemente menor que los anteriores. El LSD (Tabla 4.XXV.b) muestra la existencia de diferencias significativas entre el suelo A y el resto ( $P<0.01$ ), pero no entre ellos.

En lo referente a los tratamientos (figura 4.15) se observan tendencias diferentes en los exudados nodulares y radicales. En los primeros, la actividad desnitrificante aumenta al disminuir la concentración de los exudados, las diferencias son significativas entre sí. En los segundos, la desnitrificación decrece según lo hace la concentración de exudados; también en este caso las diferencias son significativas (tabla XXV.a). Al comparar los tratamientos nodulares y radicales no se aprecian diferencias entre los tratamientos T1N frente a T2R y T3R, y T1R con T3N. Al comparar los tratamientos y controles cabe destacar que T1N no presenta diferencias significativas con respecto a C+E y C, mientras que T1R si las presenta respecto a C+E.

Entre los controles la mayor desnitrificación se aprecia en los radicales. En los nodulares, C frente a Ca y C+E no muestran diferencias; en los radicales no presentan diferencias estadísticas 2C y C+E.

Como ya se ha señalado anteriormente la interacción es significativa. El comportamiento de los suelos por separado es semejante al descrito, si bien hay que apuntar que debido a la escasa actividad detectada en el suelo C las diferencias entre los tratamientos N no son significativas, apreciándose diferencias solo en los radicales.

En las tablas y figuras siguientes las abreviaturas empleadas son: T1, T2 y T3 : tratamientos 1, 2 y 3 (corresponden respectivamente con la incorporación de los exudados nodulares (N) y radicales (R) al 10%, 5% y 2%, sobre los suelos ensayados. También se emplean dichos sufijos en el caso de los controles). Ca: control con agua a CRM; Co: control con carbono orgánico y agua a CRM; 2Co: control con carbono orgánico doble concentración y agua a CRM; C+E: control con carbono orgánico y exudados a CRM. A, B, C y D son los suelos ensayados. Unidades: nmoles N<sub>2</sub>O/g suelo/ hora.

Tabla 4.XXIII. Resultados de la desnitrificación potencial total en los suelos A, B, C y D tratados con los exudados nodulares, radicales y en los controles.

	Suelo A	Suelo B	Suelo C	Suelo D
T1N	4.133 ± .359	2.976 ± .000	0.223 ± .030	2.562 ± .144
T2N	4.858 ± .262	4.372 ± .030	0.300 ± .006	3.895 ± .243
T3N	5.889 ± .446	4.636 ± .038	1.277 ± .088	4.756 ± .122
T1R	5.934 ± .026	4.835 ± .039	2.543 ± .005	4.061 ± .001
T2R	4.266 ± .015	3.455 ± .037	1.251 ± .004	2.212 ± .005
T3R	3.505 ± .679	2.177 ± .050	0.787 ± .006	1.862 ± .030
CoN	3.877 ± .047	2.230 ± .029	0.490 ± .070	2.360 ± .081
2CoN	6.160 ± .051	4.213 ± .023	0.303 ± .007	4.764 ± .190
C+EN	4.070 ± .023	3.080 ± .012	0.270 ± .009	3.240 ± .114
CoR	3.895 ± .047	4.718 ± .048	3.051 ± .004	4.136 ± .010
2CoR	7.032 ± .014	6.237 ± .011	6.404 ± .004	6.561 ± .004
C+ER	5.926 ± .034	6.322 ± .000	6.452 ± .027	7.411 ± .040
Ca	3.484 ± .122	1.860 ± .057	0.428 ± .011	1.695 ± .093

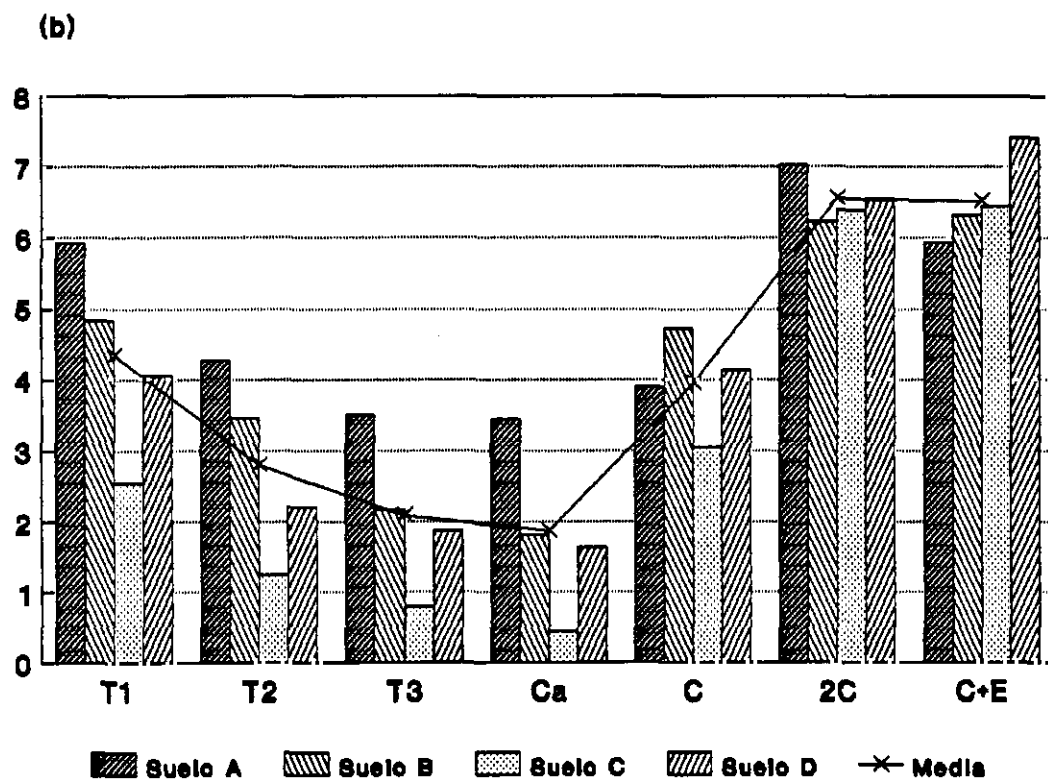
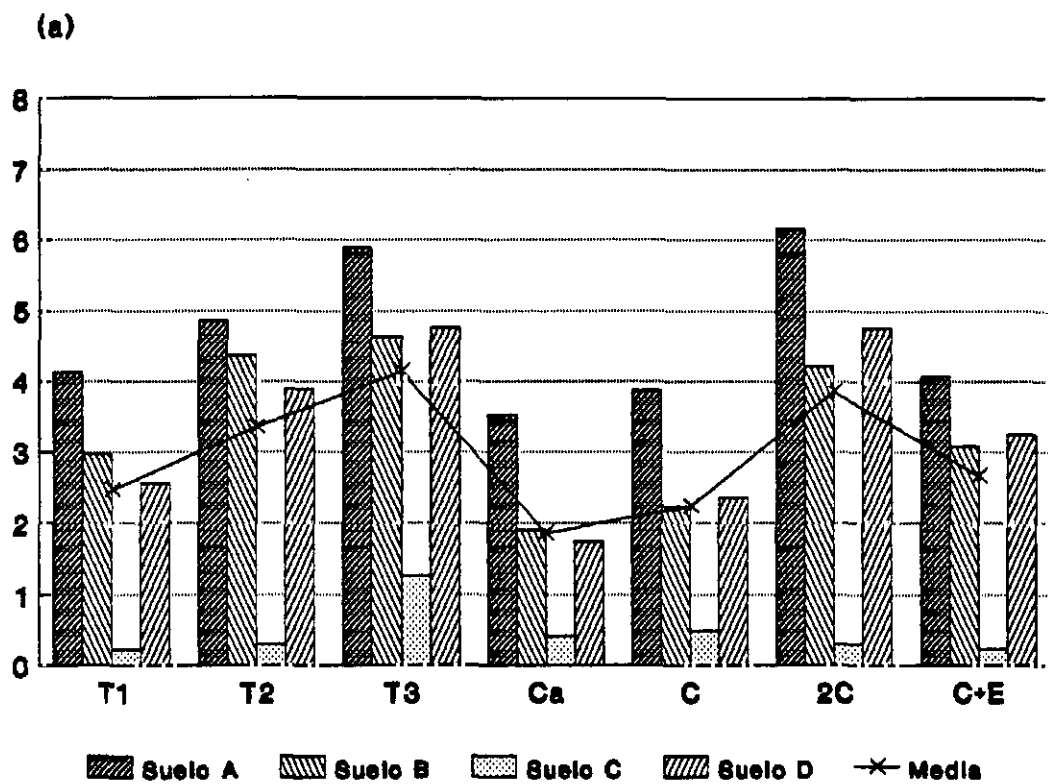


Figura 4.15. Resultados de desnitrificación potencial en presencia de exudados nodulares (a) y radicales (b) en los distintos suelos ensayados.

Tabla 4.XXIV. Resultados del ANOVA de la desnitrificación potencial en los suelos ensayados tratados con los exudados nodulares, radicales y en los controles.

F. de variación	G.l.	F	p	Significación
Tratamientos y controles	12	102.21	$1.78 \times 10^{-7}$	S. (**)
Suelos	3	229.47	$< 10^{-7}$	S. (**)
Interacción	36	7.77	$5.36 \times 10^{-7}$	S. (**)

N.S.= no significativo S.=significativo. \*\* = $p<0.01$

Tablas 4.XXV.a y b. Resultados de los LSDs en tratamientos (a) y suelos (b) del potencial desnitrificante.

**Tratamientos y Controles**

(a)

Diagram illustrating the experimental design for the comparison of treatments and controls. The treatments are arranged in a grid, with rows labeled T1N, T2N, T3N, T1R, T2R, T3R, Co, 2co, C+E, Co, 2co, C+E. The columns are labeled T1N, T2N, T3N, T1R, T2R, T3R, Co, 2co, C+E, Co, 2co, C+E. The treatments are grouped into two main categories: N (Nitrogen) and R (Residue). The treatments are arranged in a grid, with rows labeled T1N, T2N, T3N, T1R, T2R, T3R, Co, 2co, C+E, Co, 2co, C+E. The treatments are grouped into two main categories: N (Nitrogen) and R (Residue). The treatments are arranged in a grid, with rows labeled T1N, T2N, T3N, T1R, T2R, T3R, Co, 2co, C+E, Co, 2co, C+E. The treatments are grouped into two main categories: N (Nitrogen) and R (Residue).

(b)

Diagram illustrating the experimental design for the comparison of treatments and controls. The treatments are arranged in a grid, with rows labeled A, B, C, D. The columns are labeled A, B, C. The treatments are grouped into two main categories: N (Nitrogen) and R (Residue). The treatments are arranged in a grid, with rows labeled A, B, C, D. The columns are labeled A, B, C. The treatments are grouped into two main categories: N (Nitrogen) and R (Residue).

#### 4.4.4.2. Efecto de los exudados de plantas noduladas y sin nodular

En la desnitrificación (tabla 4.XXVI y figura 4.16), el ANOVA (tabla 4.XXVII) indica diferencias significativas entre suelos ( $F=360.91$ ,  $p<0.01$ ), tratamientos ( $F=281.28$ ,  $p<0.01$ ) y la interacción ( $F=6.37$ ,  $p<0.01$ ). Los LSD de tratamientos y suelos se muestran en las tablas 4. XXVIII.a y b. Los de la interacción se recogen en el apéndice B, tabla B.VII.

Los suelos muestran una tasa creciente de desnitrificación:  $A > B > D > C$  y son estadísticamente distintos. Respecto a los tratamientos encontramos que al aumentar la concentración aumenta la tasa de desnitrificación, tanto en el caso de PSN como en PN. El LSD muestra diferencias significativas en ambos casos.

Al considerar los independientemente los suelos ensayados, se puede ver que las tendencias son las mismas en todos ellos, y desde el punto de vista estadístico el comportamiento es análogo en cada uno al descrito en el párrafo anterior, salvo en el suelo B, que no hay diferencias estadísticas entre T1 de PN y los controles antes citados.



En las tablas y figuras siguientes las abreviaturas empleadas son: T1, T2 y T3 : tratamientos 1, 2 y 3 (corresponden respectivamente con la incorporación de los exudados de plantas noduladas (\*, PN) y sin nodular (PSN) al 100%, 50% y 25%, sobre los suelos ensayados. También se emplean dichos sufijos en los controles). Ca: control con agua a CRM; Co: control con carbono orgánico y agua a CRM; 2C: control con carbono orgánico doble concentración y agua a CRM; C+E: control con carbono orgánico y exudados a CRM. CN: control con Crone+N. SN: control con Crone-N. A, B, C y D son los suelos ensayados. Unidades: nmoles N<sub>2</sub>O/g suelo/ hora.

Tabla 4.XXVI. Resultados de la desnitrificación potencial total en los suelos A, B, C y D tratados con los exudados de plantas noduladas, sin nodular y en los controles.

	Suelo A	Suelo B	Suelo C	Suelo D
T1PN	5.629 ± .040	4.631 ± .088	2.359 ± .003	3.071 ± .013
T2PN	4.226 ± .097	2.443 ± .231	1.323 ± .005	2.189 ± .004
T3PN	3.810 ± .092	1.847 ± .012	0.673 ± .006	1.027 ± .007
T1PSN	8.412 ± .105	7.634 ± .160	6.341 ± .544	6.997 ± .142
T2PSN	6.312 ± .448	5.314 ± .187	4.482 ± .302	5.312 ± .193
T3PSN	3.417 ± .195	2.828 ± .339	2.191 ± .115	2.649 ± .151
Ca	3.550 ± .093	1.812 ± .051	0.020 ± .007	0.626 ± .048
CN	7.311 ± .395	6.682 ± .361	5.531 ± .103	5.882 ± .146
SN	3.731 ± .137	1.852 ± .004	0.032 ± .004	0.928 ± .044
CoPN	5.485 ± .025	4.710 ± .005	2.221 ± .016	3.221 ± .045
2CPN	5.719 ± .084	6.018 ± .051	3.524 ± .003	5.245 ± .026
C+EPN	6.016 ± .007	9.929 ± .007	2.123 ± .005	5.596 ± .303
CoPSN	6.314 ± .142	5.286 ± .082	4.333 ± .016	5.257 ± .139
2CPSN	6.513 ± .051	5.431 ± .268	4.732 ± .125	5.596 ± .211
C+EPSN	6.493 ± .296	6.395 ± .278	4.695 ± .151	5.601 ± .133

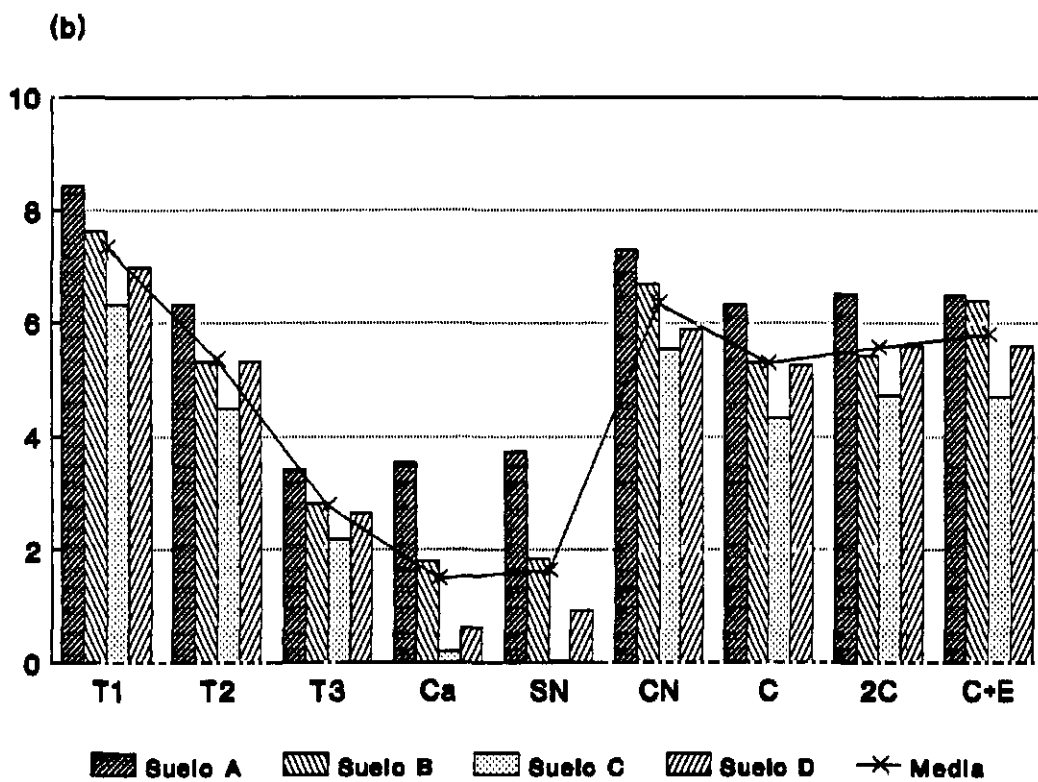
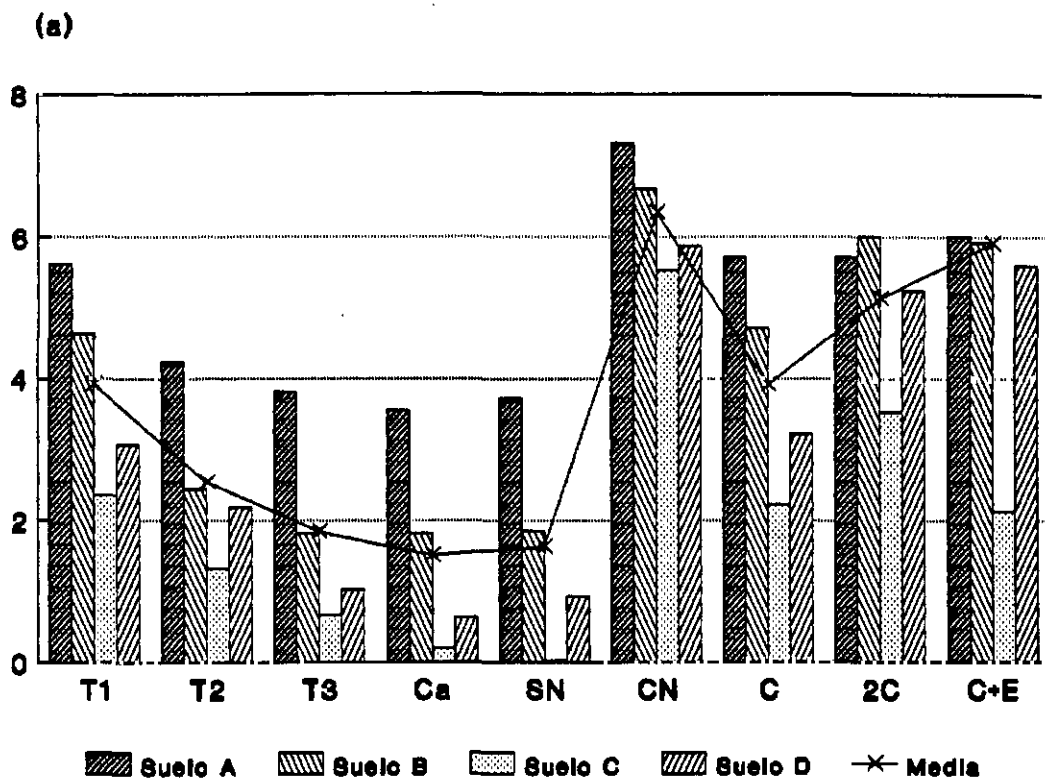


Figura 4.16. Resultados de desnitrificación potencial en presencia de exudados de plantas noduladas (a) y sin nodular (b) en los distintos suelos ensayados.

F. de variación	G.l.	F	p	Significación
Tratamientos y controles	14	281.28	$3.57 \times 10^{-7}$	S. (**)
Suelos	3	360.91	$< 10^{-7}$	S. (**)
Interacción	42	6.37	$2.38 \times 10^{-7}$	S. (**)

Tablas 4.XXVIII.a y b. Resultados de los LSDs en tratamientos (a) y suelos (b) del potencial desnitrificante.

**PN:** Plantas noduladas  
**PAN:** Plantas sin nodular

#### 4.4.5. Producción de CO<sub>2</sub>

##### 4.4.5.1. Efecto de los exudados nodulares y radicales

Los resultados de producción de CO<sub>2</sub> aparecen en la tabla 4.XXIX y se representan en la figura 4.17. El ANOVA y los LSD realizados se muestran en las tablas 4.XXX y 4.XXXI.a y b. Los LSD de la interacción se exponen en el apéndice B, Tabla B.VIII.

Las diferencias entre los cuatro suelos son significativas ( $p < 0.01$ ), la mayor producción de CO<sub>2</sub> corresponde al suelo B (217.37 nmol CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) seguido del A (175.64 nmol CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>), D (104.68 nmol CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>) y finalmente el C (48.24 nmol CO<sub>2</sub> g<sup>-1</sup> h<sup>-1</sup>).

Al aplicar los tratamientos nodulares y radicales, la tasa de producción de CO<sub>2</sub> aumenta con la concentración de carbono orgánico. Los distintos tratamientos difieren entre sí significativamente ( $p < 0.01$ ), sólo T1R y T2N no muestran diferencias significativas. Todos los controles muestran entre si y con los tratamientos diferencias significativas ( $p < 0.01$ ).

En cuanto a la interacción, que resulta significativa ( $p < 0.01$ ) encontramos que las tendencias descritas en los 4 suelos en conjunto se repiten al considerarlos aisladamente (apéndice B, tabla B.VIII).

En las tablas y figuras siguientes las abreviaturas empleadas son: T1, T2 y T3 : tratamientos 1, 2 y 3 (corresponden respectivamente a la aplicación de exudados nodulares (N) y radicales (R) al 10%, 5% y 2%, sobre los suelos ensayados. También se emplean dichos sufijos en los controles). Ca: control con agua a CRM; Co: control con carbono orgánico y agua a CRM; 2Co: control con carbono orgánico doble concentración y agua a CRM; C+E: control con carbono orgánico y exudados a CRM. A, B, C y D son los suelos ensayados. Unidades: nmoles CO<sub>2</sub> /g tierra/ hora.

Tabla 4.XXIX. Resultados de producción de CO<sub>2</sub> en los suelos A, B, C y D, tratados con exudados nodulares y radicales así como en los controles.

	Suelo A	Suelo B	Suelo C	Suelo D
T1N	130.6 ± 5.88	177.7 ± 11.7	44.16 ± 2.38	127.5 ± 2.99
T2N	119.8 ± 1.17	125.4 ± 3.47	34.72 ± 1.07	117.3 ± 2.94
T3N	77.72 ± 8.06	100.7 ± 4.26	22.96 ± 0.66	91.34 ± 1.90
T1R	100.3 ± 1.08	161.8 ± 5.93	36.49 ± 0.70	118.9 ± 1.61
T2R	96.22 ± 0.49	107.3 ± 0.89	26.80 ± 0.26	99.27 ± 0.54
T3R	68.84 ± 3.52	88.08 ± 1.30	19.93 ± 1.06	89.77 ± 0.73
CoN	200.5 ± 1.65	250.1 ± 1.01	50.20 ± 0.92	229.4 ± 1.78
2CoN	305.1 ± 3.09	254.3 ± 1.24	62.91 ± 1.18	321.1 ± 2.14
C+EN	351.9 ± 1.40	516.1 ± 2.49	120.1 ± 0.47	371.3 ± 1.90
CoR	186.6 ± 6.11	217.8 ± 1.11	41.84 ± 0.68	212.7 ± 1.22
2CoR	258.5 ± 7.86	264.5 ± 3.93	51.87 ± 0.26	305.3 ± 2.33
C+ER	326.1 ± 2.25	484.8 ± 8.37	101.3 ± 0.47	326.8 ± 0.65
Ca	61.16 ± 1.23	76.69 ± 0.97	19.81 ± 0.19	82.68 ± 1.89

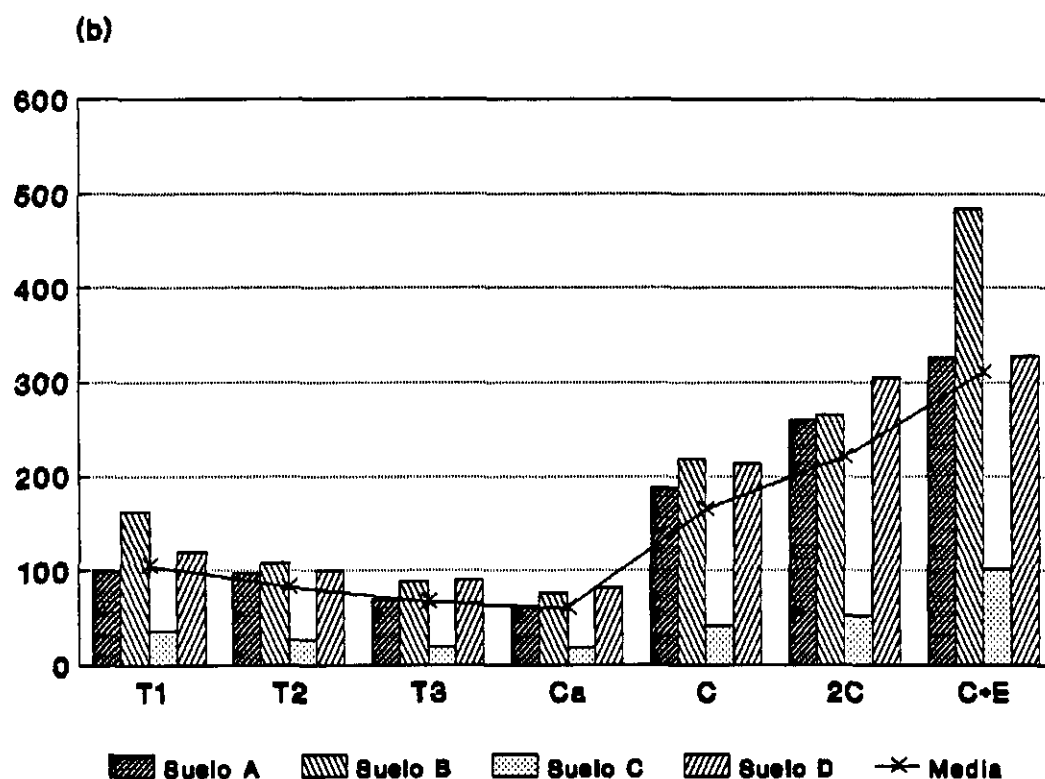
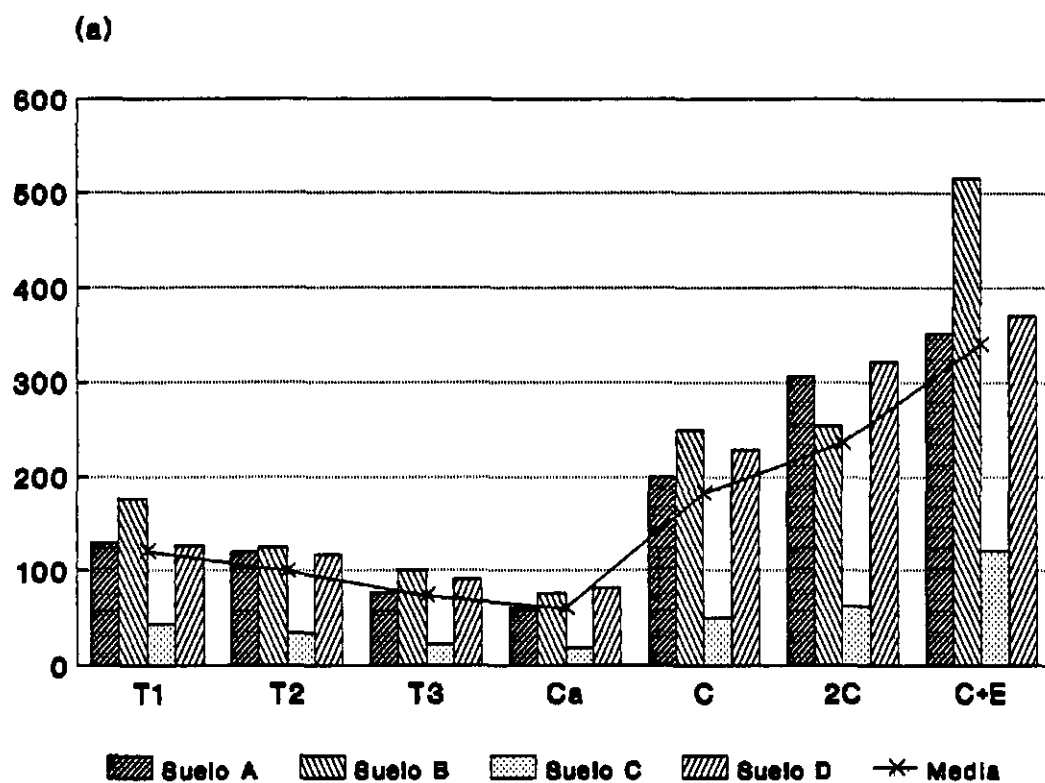


Figura 4.17. Resultados de la producción de CO<sub>2</sub> en presencia de exudados nodulares (a) y radicales (b) en los distintos suelos ensayados.

Tabla 4.XXX. Resultados del ANOVA de la producción potencial de CO<sub>2</sub> en los suelos tratados con exudados nodulares y radicales así como en los controles.

F. de variación	G.l.	F	p	Significación
Tratamientos y controles	12	2038.4	$5 \times 10^{-8}$	S.(**)
Suelos	3	4237.6	$< 10^{-7}$	S.(**)
Interacción	36	157.1	$4.7 \times 10^{-7}$	S.(**)

N.S.= no significativo    S.=significativo.    \*\* = $p<0.01$

Tablas 4.XXXI.a y b. Resultados de los LSDs en tratamientos (a) y suelos (b) del potencial de producción de CO<sub>2</sub>.

Tratamientos y Controles												
							N			R		
							Co	200	C+E	Co	200	C+E
							T3R	T2R	T1R	T3N	T2N	T1N
R	Ca	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
	C+E	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
	200	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
	Co	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
	C+E	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
	200	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
N	Co	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
	T3R	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
	T2R	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
	T1R	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
	T3N	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
	T2N	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
Suelos												
(b)		A B C										
		D	**	**	**							
		C	**	**	**							
		B	**	**	**							

#### 4.4.5.2. Efectos de los exudados de plantas noduladas y sin nodular

Los resultados de producción de  $\text{CO}_2$  aparecen en la tabla 4.XXXII y se representan en la figura 4.18. El ANOVA y los LSD realizados se muestran en las tablas 4.XXXIII, y 4.XXXIV a y b. El ANOVA nos muestra diferencias significativas entre suelos ( $F= 10931.66$ ,  $p<0.01$ ), tratamientos ( $F=5466.24$ ,  $p<0.01$ ) y en la interacción ( $F=460.24$ ,  $p<0.01$ ), (véase apéndice B, tabla B.IX).

Los suelos son estadísticamente diferentes ( $p<0.01$ ) mostrando la mayor tasa de producción de  $\text{CO}_2$  en el orden decreciente que sigue:  $B > D > A > C$ .

Los exudados de PN y PSN tienen efectos análogos sobre los diferentes suelos: aumenta la producción de  $\text{CO}_2$  al aumentar la concentración de los exudados, siendo este efecto más marcado en PN. En ambos casos existen diferencias estadísticas entre ellos y son significativamente diferentes de sus respectivos controles (véase apéndice B, tabla B.IX).

Estas consideraciones podemos hacerlas extensivas a los cuatro suelos ensayados, a excepción de dos casos: por un lado, en los suelos A y B no hay diferencias entre T1PN y su control C, y por otro en el suelo C tampoco hay diferencias entre T1PSN y su control con carbono orgánico (C); en este mismo suelo encontramos que tampoco hay diferencias entre los tratamientos con exudados menos concentrados (T2 y T3), tanto de PN como de PSN.



En las tablas y figuras siguientes las abreviaturas empleadas son: T1, T2 y T3 : tratamientos 1, 2 y 3 (corresponden respectivamente a la aplicación de exudados de plantas noduladas (\*,PN) y sin nodular (PSN) al 100%, 50% y 25%, sobre los suelos ensayados. También se emplean dichos sufijos en los distintos controles). Ca: control con agua a CRM; C: control con carbono orgánico y agua a CRM; 2C: control con carbono orgánico doble concentración y agua a CRM; C+E: control con carbono orgánico y exudados a CRM. CN: Control con Crone+N. SN: Control con Crone-N. A, B, C y D son los suelos ensayados. Unidades: nmoles CO<sub>2</sub> /g tierra/ hora.

Tabla 4.XXVI. Resultados de producción de CO<sub>2</sub> en los suelos A, B, C y D, tratados con exudados totales de plantas noduladas y sin nodular así como en los controles.

	Suelo A	Suelo B	Suelo C	Suelo D
T1PN	140.3 ± 2.35	162.2 ± 1.43	42.34 ± 0.56	125.1 ± 0.97
T2PN	120.3 ± 1.03	134.3 ± 5.16	25.90 ± 0.21	110.4 ± 0.44
T3PN	85.32 ± 0.42	96.34 ± 0.53	15.53 ± 0.19	91.90 ± 0.36
T1PSN	120.2 ± 1.83	143.3 ± 1.97	40.52 ± 1.44	137.2 ± 1.44
T2PSN	100.3 ± 1.61	112.2 ± 2.56	20.44 ± 1.45	118.3 ± 1.07
T3PSN	80.21 ± 0.55	87.32 ± 1.34	12.36 ± 0.28	84.45 ± 0.75
Ca	69.32 ± 1.53	75.17 ± 0.07	11.32 ± 0.47	81.20 ± 0.33
CN	65.37 ± 1.27	70.35 ± 1.17	9.31 ± 0.53	82.79 ± 1.55
SN	73.29 ± 1.87	78.33 ± 0.45	17.21 ± 0.19	90.50 ± 0.29
CPN	160.4 ± 2.37	271.4 ± 3.72	36.47 ± 0.25	219.9 ± 0.68
2CPN	280.7 ± 4.98	460.8 ± 2.81	81.01 ± 0.33	311.3 ± 1.71
C+EPN	310.3 ± 0.48	490.2 ± 6.20	74.08 ± 0.52	339.1 ± 1.19
CPSN	186.6 ± 6.11	217.8 ± 1.11	41.84 ± 0.68	212.7 ± 1.22
2CPSN	260.2 ± 3.30	341.3 ± 2.81	75.39 ± 1.29	321.9 ± 1.62
C+EPSN	300.4 ± 5.42	510.2 ± 7.35	136.2 ± 1.99	559.2 ± 4.36

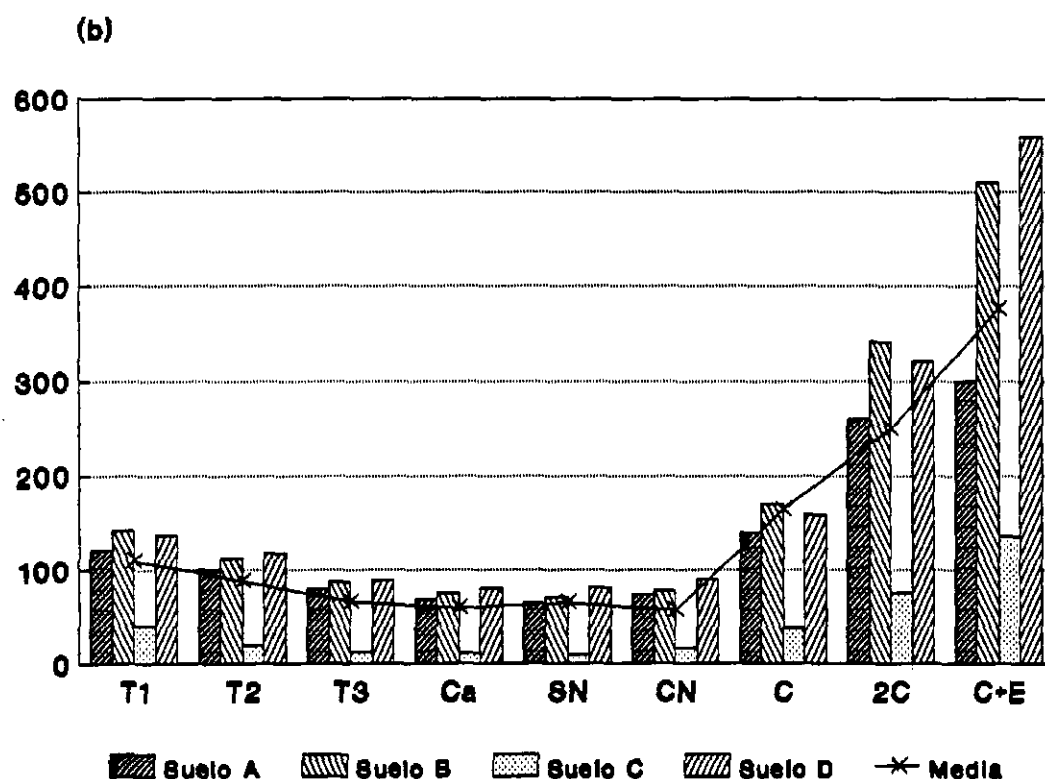
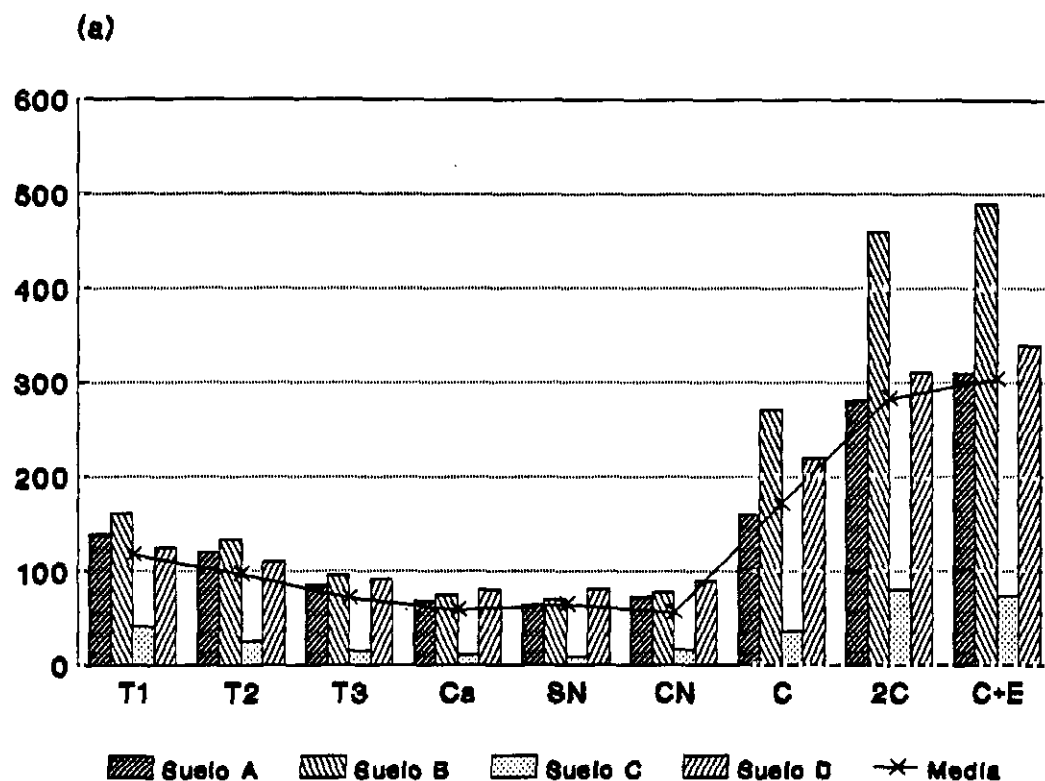


Figura 4.18. Resultados de producción de CO<sub>2</sub> en presencia de exudados de plantas noduladas (a) y sin nodular (b) en los distintos suelos ensayados.

F. de variación	G.l.	F	P	Significación
Tratamientos y controles	14	5466.24	$1.19 \times 10^{-7}$	S. (**)
Suelos	3	10931.66	$1.19 \times 10^{-7}$	S. (**)
Interacción	42	460.24	$1.01 \times 10^{-7}$	S. (**)

Tablas 4.XXXIV.a y b. Resultados de los LSDs en tratamientos (a) y suelos (b) del potencial de producción de CO<sub>2</sub>.

**PN, +:** Plantas noduladas  
**PN:** Plantas sin nodular

## **5. DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL SENTIDO PLANTA-SUELO**

Son muchos los autores que han demostrado la importancia de la microflora rizosférica como componente activo del ecosistema (Nakas y Klein, 1980; Sherwood y Klein, 1981; Dahm, (1984 a, b,)). Además los microorganismos rizosféricos pueden aportar nutrientes a los productores primarios, actuando además como protectores de las plantas frente a al estrés ambiental (Coleman et al., 1983). En este sentido, las bacterias rizosféricas se han evidenciado como 4 ó 5 veces más rápidas que las no rizosféricas en los cambios bioquímicos (Rovira y McDougal, 1967; Richard, 1972). Recientes estudios han mostrado las críticas relaciones entre exudados, microflora rizosférica, microfauna y mesofauna que aceleran el reciclado de la materia orgánica, facilitando a las plantas la absorción de nutrientes, sobre todo en condiciones en las que estos son escasos (Clarholm, 1985; Ingham et al., 1985).

Para evaluar el efecto de los exudados sobre los microorganismos edáficos implicados en el ciclo del nitrógeno, se han usado métodos de extendido manejo. Hemos considerado grupos funcionales o fisiológicos y no entidades taxonómicas concretas, ya que el objetivo de esta parte del trabajo es conocer el resultado de un proceso biológico, sea cual fuere el agente efector del mismo. Este planteamiento es el habitual en este tipo de estudios y es empleado por numerosos autores como Remacle y De Leval (1975), Pozuelo (1984), Turner y Franz (1985), Bermúdez de Castro y Gutiérrez Mañero (1987), Llinares (1990) y Sprent (1990), entre otros.

En la caracterización de los exudados y suelos ensayados se han incluido parámetros generales, pero íntimamente relacionados con la dinámica del nitrógeno, por ejemplo el nitrógeno total o el carbono orgánico, apropiados para considerar la cantidad y naturaleza de la materia orgánica presente en el sustrato. Se han incluido también otros parámetros más específicos como el nitrógeno-nitrato o el nitrógeno-amonio. Ambos productos pueden dar una idea de la actividad biológica de los grupos funcionales que utilizan estos iones como fuente energética para su desarrollo o como productos de su metabolismo.

En la caracterización bioquímica de los exudados se han considerado los grupos de moléculas que además de revestir interés desde el punto de vista fisiológico en las actividades de los grupos de microorganismos estudiados, aportan información sobre las características de la exudación en las distintas condiciones ensayadas. Por ello hemos estudiado azúcares, lípidos y proteínas, cuantitativa y cualitativamente. El estudio de estos grupos de compuestos en los exudados es bastante generalizado y se ha efectuado sobre distintos materiales

biológicos como refrenda la abundante literatura al respecto (Rovira, 1959; Ayers y Thornton, 1968; Vancura, 1964; Smucker y Erickson, 1987; Svenningsson et al., 1990). Respecto a los métodos de obtención de los exudados y los métodos de separación e identificación de los grupos de moléculas consideradas se discuten posteriormente.

Para evaluar la fijación de nitrógeno en suelos se empleó el método de la actividad reductora del acetileno (ARA) en las condiciones propuestas por Grant y Binkley (1987), debido a la rapidez y escasa manipulación de los suelos en el laboratorio. Las limitaciones del método (en la medida de actividad de nódulos) han sido bien contrastadas, si bien estas limitaciones no son aplicables a la fijación libre; este método es empleado de rutina por diversos autores (Danso et al., 1992).

Los potenciales amonificante y nitrificante se obtuvieron según el método de Robertson y Vitousek (1981), el cual, aun requiriendo tiempos de incubación relativamente largos, se considera bastante apropiado para evaluar el potencial nitrificante, pues como indica Alexander (1980) entre otros autores, los microorganismos nitrificantes poseen un metabolismo más lento en comparación con el resto de los grupos fisiológicos del ciclo del nitrógeno. No obstante otros autores ponen en duda la eficacia de este método en lo que respecta a la amonificación ya que no contempla la volatilización ni la fijación en arcillas (Broadbent Y Nashima, 1967; Azhar et al., 1986; Hsieh, 1988). Sin embargo el potencial amonificante determinado por este procedimiento refleja más fielmente la actividad de los suelos, ya que los fenómenos antes mencionados se producen de forma natural a las temperaturas y presión normales. Además, para Clarck (1981), con las temperaturas de incubación empleadas la volatilización de amoníaco no sería superior al 15% del amonio fijado y, según Freny et al. (1981) estas pérdidas se compensan por deposición seca de dicho compuesto.

Por otro lado la mayor parte de los procesos estudiados se ven modificados por múltiples factores, entre los que cabe destacar el tipo de suelo que sirve de soporte a los mismos. Por esta razón consideramos las variaciones inducidas por los tratamientos en cada suelo o para el conjunto de los tres suelos empleados simultáneamente, pero no la interacción con suelos diferentes.

La desnitrificación total se evaluó en las condiciones propuestas por Vinther (1984) aplicadas al método de inhibición por acetileno de Yoshinari y Knowles (1976) y contempla exclusivamente las pérdidas de nitrógeno por

desnitrificación. No hay interferencia del proceso de nitrificación, puesto que como demuestran Klemetsson et al., (1986) las presiones altas de acetileno (como el 10% de la atmósfera de incubación) inhiben dicho proceso.

La producción de CO<sub>2</sub>, se empleó exclusivamente como indicador de la actividad de la microflora total. Alexander (1980) apunta en este sentido que la relación entre el número de microorganismos y la producción de CO<sub>2</sub> no está totalmente demostrada, existiendo sólo en algunas ocasiones, como cuando la fuente de carbono es única y la microflora monoespecífica. Sin embargo la producción de CO<sub>2</sub> puede indicarnos la funcionalidad de los microorganismos edáficos.

Otra de las consideraciones que debemos hacer respecto a los métodos empleados, es la forma de obtención de los exudados. Los trabajos realizados por distintos autores se centran sobre exudados radicales, mayoritariamente de plantas no diazotrofas (Ayers y Thornton, 1968; Bolton et al., 1989 o Svenningsson et al., 1990). Considerando que un nódulo radical conserva la estructura de la raíz, los productos exudados serán análogos en composición a los de una raíz sin nódulos, con las modificaciones que puedan ser debidas al endófito. La mayoría de estos métodos recogen los exudados en vivo con objetivos básicamente analíticos, para ello emplean soportes inertes como perlita (Ayers y Thornton, 1968) o soluciones donde se han desarrollado las plantas (Rovira, 1959; Sulochana, 1962). Los exudados de plantas noduladas (PN) y sin nodular (PSN) se recolectaron en solución nutritiva (con o sin nitrógeno según cada caso). Sin embargo, son escasos o nulos los estudios enfocados hacia el efecto de los exudados sobre el suelo, y comunidades edáficas que en él se desarrollan. Hay que considerar las diferencias existentes entre los bloques de tratamientos, por un lado PN, PSN y por otro N,R. En estos últimos hemos de tener en cuenta que como efecto del estrés hídrico y de la falta de afluencia de fotosintatos a la raíz y nódulos, el proceso de exudación es más acusado (Rovira, 1969; Klein et al., 1989). Por contra en los exudados PN y PSN se ha buscado que las condiciones de crecimiento fueran las más "normales" limitando los factores de estrés al mínimo, de tal modo que las posibles diferencias estuviesen referidas a una sola variable: la presencia o ausencia de nódulos radicales. Otros autores han estudiado la naturaleza de los exudados en condiciones de estrés (Svenningsson et al., 1990), considerando que, de esta manera, la concentración de compuestos orgánicos en los mismos será mucho mayor (los exudados nodulares y radicales fueron recogidos en condiciones de estrés tal y como se indicó en 2.5.1.)

Otro aspecto a considerar es la proporción en que se añaden las soluciones de exudados a los suelos, que fue en todas las pruebas a capacidad de retención máxima (CRM) de cada suelo. De esta forma se favorece que los compuestos presentes en los exudados entren en contacto con la porción de suelo ensayada, pues muchas veces las sustancias son de difusión restringida (Foster, 1986). A la vez quedan espacios microaerobios en el complejo poroso del suelo, lo que permite la difusión de gases. Como ya se ha señalado, la humedad del suelo afecta de modo distinto a los grupos funcionales del ciclo del nitrógeno, pero, en general, un porcentaje alto de humedad optimiza estos procesos. La fijación de nitrógeno se ve favorecida al disminuir (con el aumento de humedad) la tensión de oxígeno. La nitrificación se acentúa cuando la humedad supera el 65% de la CRM (Sabey, 1967). El proceso de desnitrificación también está favorecido en condiciones de humedad elevada puesto que este proceso requiere bajas tensiones de oxígeno (Terry y Tate, 1980).

El método empleado para el análisis de hidratos de carbono presentes en los exudados cumple un doble objetivo: por un lado permite una identificación eficaz y relativamente rápida y por otro es sencillo. Métodos semejantes han sido empleados por distintos autores para el estudio de azúcares presentes en los exudados de diferentes especies vegetales (Rovira, 1969; Vancura, 1964) y han evidenciado su eficacia al compararlos con otros más complejos empleados como cromatografía de gases (Sveninngsson et al., 1990).

En lo referente a los azúcares encontrados en los distintos tratamientos hay que resaltar tres hechos notables:

(i) la composición de N y R, en las condiciones ensayadas no difieren en su composición.

(ii) En PN y PSN la composición no difiere sustancialmente entre ambos salvo en dos azúcares exclusivos de cada tipo: lactosa (en PSN) y galactosa (en PN).

(iii) Las diferencias más notables las podemos señalar entre los dos grupos de tratamientos N y R, por una parte y PN y PSN por otra.

Las consideraciones que podemos efectuar sobre ello son dos: en primer lugar, la naturaleza de exudados no depende sólo de las condiciones en que se desarrolla la raíz (Hale et al., 1978; Wipps, 1984) sino que también depende de la estructura y características de esta: no exudan los mismos azúcares las raíces que los nódulos. Las causas últimas de este efecto las encontramos en aspectos fisiológicos en respuesta a la simbiosis que se establece con Frankia.



En segundo lugar las diferencias encontradas cualitativa y cuantitativamente de los exudados en condiciones "normales" (PN y PSN) y de estrés hídrico (N y R) vendrían justificados por este factor. Como otros autores señalan las diferencias en ambos casos vendrían determinadas por aumentos en la autólisis de la raíz (Martin, 1977a), incrementos en la permeabilidad de membrana o de los procesos metabólicos que en ella se dan (Mukherjee y Choundry, 1981; Hsiao, 1973).

En lo que se refiere a los resultados obtenidos por otros autores, son muy escasos los trabajos de caracterización de exudados radicales en plantas leñosas y menos aún en diazotrofas. Podemos señalar en este sentido el trabajo de Reid (1974) que aborda el análisis de aminoácidos en Pinus ponderosa. Si son abundantes los trabajos respecto a exudados de plantas herbáceas. Nuestros resultados, en cualquiera de los dos grupos de exudados, muestran una menor variedad de azúcares a los encontrados por Vancura (1964) en trigo y centeno en condiciones normales, siendo el único diferente respecto a los encontrados por dicho autor, la lactosa. Tampoco son notorias las diferencias en composición de los exudados de plántulas de pino que encuentra Smith (1969) mediante métodos semejantes. Consideraciones análogas podemos hacer respecto a los trabajos de Vancura y Hanlikora (1972), Hamlem et al. (1972) o Shay y Hale (1973).

Lo más destacable que podemos reseñar es la escasa variedad de azúcares encontrados por nosotros respecto a otros autores. Esto puede venir justificado por la especie utilizada, por las condiciones de cultivo de las plantas y por la edad de las mismas, factores todos ellos probados en numerosas especies.

El método empleado para la determinación de lípidos (Bligh y Dyer, 1959), permite una rápida identificación y rinde buenos resultados. Sin embargo, tal y como señalan Svenningsson et al. (1990), existen dificultades a la hora de determinar los lípidos de los exudados, dada su insolubilidad en soluciones acuosas (cómo el medio de recolección de los exudados) y la tendencia a ser adsorbidos por los medios de soporte.

Son dos los aspectos más destacables de los resultados obtenidos:

(i) La variedad de los lípidos exudados por los alisos en condiciones "normales" es diferente en PN y PSN, no ocurriendo esto en los exudados en condiciones de estrés (N y R).

(ii) Es mayor el contenido en lípidos de los exudados en condiciones de estrés que en condiciones "normales".

Estas diferencias pueden deberse a los cambios sufridos principalmente por las membranas, que indudablemente han de verse reflejados en la composición de sustancias hidrofóbicas exudadas. Por una parte debido a la alteración de la permeabilidad de la membrana en las células menos afectadas durante el estrés y por otra debido a la destrucción de las membranas en las células que mueren.

Sin embargo las diferencias cualitativas entre PN y PSN sugieren un efecto del endófito. Podemos considerar dos hipótesis que no son excluyentes: (i) que el endófito influya sobre las sustancias liposolubles constitutivas de la planta durante el crecimiento vegetal y (ii) que el endófito actúe indirectamente sobre la exudación lipídica por afectar al metabolismo de dichos compuestos en zonas próximas a los nódulos o en los propios nódulos.

Una última consideración que hemos de hacer se refiere a la mayor exudación de lípidos en condiciones de estrés, como señalan Sverinsson y Liljerberg (1986). Esta consideración es razonable debido a la destrucción de membranas que se produce en estas condiciones.

Juo y Stotzky (1971) fueron los primeros autores que hemos encontrado en la literatura consultada que emplean el método de Lowry *et al.* (1951), para estimar cuantitativamente las proteínas totales en exudados radicales, empleando como material biológico guisante, maíz y girasol. El rendimiento de esta técnica es aceptable como ponen de manifiesto los autores arriba citados. En nuestro caso, además del método de Lowry se ha empleado la reacción de Biuret.

Como se ha señalado, existen diferencias notorias entre los exudados en condiciones de estrés (N y R, con mayor contenido en proteínas y polifenoles) y en condiciones "normales" (PN y PSN). La mayor cantidad de polifenoles en N y R, vendría justificada por el mayor grado de lignificación tanto de nódulos como de raíces frente a la nula o escasa lignificación de las plantas usadas en las experiencias de PN y PSN, más que a las condiciones del experimento.

En cada uno de los grupos de exudados la mayor concentración de proteínas la encontramos en N y en PN, es decir en aquellos en los que intervienen los nódulos. Por ello el incremento en las concentraciones de exudado deben de estar causadas (i) porque se produce liberación de proteínas del endófito hacia el exterior a través de las células corticales y epidérmicas o bien (ii) que el endófito actúe sobre la fisiología del vegetal de tal modo que se de un incremento de la exudación protéica endógena.

De nuestros los resultados se deduce que los exudados N y R activan el ARA potencial en los suelos ensayados. El más concentrado de los tratamientos con exudados nodulares, es el que exhibe un ARA mayor y diferente al resto. Las causas de estos efectos podemos encontrarlas en tres posibles factores:

(i) Como han evidenciado distintos autores (Child, 1981) uno de los factores que mas limitan la fijación libre es la disponibilidad de materia orgánica oxidable. Esta podría ser aportada vía exudados, como han demostrado diferentes trabajos y muy especialmente hidratos de carbono (Vancura, 1964, Svennignsson et al., 1990). En este sentido son también son numerosos los autores que han señalado como en la rizosfera de diferentes plantas se incrementa la actividad fijadora libre precisamente por el aporte de materia orgánica carbonada (Neyra y Dobëreinner, 1983).

(ii) La disponibilidad de molibdeno, cofactor de la nitrogenasa, es otro de los factores que pueden afectar decisivamente a la fijación libre (Weber et al., 1987). Los exudados nodulares pueden aportar cantidades apreciables de este metal (procedente del endófito, al desencadenarse el proceso necrótico) y podría de este modo ser mas accesible para las bacterias diazotrofas libres.

(iii) La presencia de sustancias de distinta naturaleza que actuasen activando o inhibiendo específicamente a los microorganismos fijadores libres. Respuestas de este tipo (mecanismos alelopáticos) han sido descritos con respecto a los microorganismos nitrificantes (Olson y Rainers, 1983; Baldwin et al., 1983).

Considerando los tres factores y nuestros resultdos podemos tarabajar con dos hipótesis que expliquen nuestros resultados:

a) Tanto en el caso de los exudados nodulares como radicales parece que el efecto activador del ARA responde al aporte de materia orgánica por parte de estos (2,66 y 2,05% de carbono orgánico en T1N y T1R respectivamente) y que conforme a lo que señalábamos en (i) facilita el proceso metabólico dado su elevado coste energético. De hecho, los controles con carbono orgánico, tanto en nodulares como en radicales muestran mayores ARAs que los tratamientos 2 y 3. El mayor incremento de actividad en los controles con carbono orgánico frente al T1N y T1R se puede explicar en razón a que el carbono orgánico que se aporta en los controles es fácilmente asimilable, mientras que el que aportan los exudados (véase caracterización bioquímica) son de naturaleza más compleja y por ello se requiere un tiempo mayor para su degradación y asimilación. Abundando en esto, los resultados de los controles con carbono orgánico doble concentrado y carbono orgánico mas exudados nos permiten comprobar lo que

mas arriba señalábamos: las tasas de ARA (tanto en los controles nodulares como radicales) muestran diferencias significativas.

b) El segundo factor que explicaría nuestros resultados sería el aporte de molibdeno. Los únicos que pueden aportar cantidades apreciables de molibdeno son los exudados nodulares y es precisamente en estos en los que encontramos un efecto activador. Sin embargo debemos descartar la hipótesis de que el Mo es el único responsable del efecto observado: las diferencias entre T1N y Cco+Mo son las únicas no significativas de dicho tratamiento.

Además de todo lo señalado hasta este punto no se puede descartar radicalmente la presencia de agente químicos que de algún modo modulen los efectos descritos. La presencia de estos compuestos habrá de evidenciarse por su aislamiento y caracterización, pudiendo, a la vista de nuestros resultados, especular con la posibilidad de que dichos compuestos estén en relación con otros señalados por autores como Rice (1984) o Freench (1985).

En los tratamientos con exudados de plantas noduladas (PN) y sin nodular (PSN) encontramos, como ya se ha señalado, un aumento del ARA con la concentración de los tratamientos PN y al revés con PSN. El conjunto de factores que podemos considerar como desencadenantes de estos efectos serían los reseñados anteriormente: presencia de materia orgánica carbonada, molibdeno y activadores específicos.

Estos resultados son diferentes a los encontrados con los exudados N y R. A la vista de estos resultados cobra mayor importancia la hipótesis que contempla la presencia de activadores o inhibidores alelopáticos. Mientras que los exudados N y R probablemente activan los fijadores a través del aporte de materia orgánica como sustrato energético, en este caso el aporte de materia orgánica sólo supone un incremento de actividad en PN, en PSN los resultados se invierten, además en presencia de materia orgánica fácilmente asimilable y exudados (control C+E) la actividad desciende frente a 2C. Estos resultados sólo pueden explicarse por la presencia en los exudados de PSN de algún inhibidor de este grupo de microorganismos. Las razones pueden ser múltiples y sólo podemos especular al respecto. En principio cabe pensar en aspectos relativos a competencias que resultan favorables para la fisiología de la planta y que permitan el asentamiento de poblaciones que faciliten el desarrollo de la simbiosis, cosa que no ocurre en el caso de PN porque ya se ha establecido.

Como ya se ha señalado los suelos exhiben ARA diferente (salvo B y D) que en cantidades totales (considerados tratamientos y controles) muestran tasas muy semejantes. las pautas de respuesta en los tratamientos y controles son superponibles. Sin embargo, interesa profundizar en las causas de las diferencias que derivan de las características de cada suelo.

Las tasas bajas del suelo C (véase su caracterización y resultados) respecto al resto, puede deberse a factores como su alto contenido en K, que tal y como señala Weber *et al.* (1983) aparece correlacionado negativamente con el ARA. Por otra parte diferentes autores han apuntado la baja tasa de ARA que se observa en suelos con poca densidad de raíces. Las raíces son importantes vías de aporte de materia orgánica y por ello, suelos con mayor biomasa radical poseen mayores ARAs (Neyra y Dobëreiner, 1983). El suelo C es indudablemente el que posee una menor densidad radical y su contenido en carbono orgánico es muy bajo por lo que no se favorece el desarrollo de este grupo de microorganismos.

Resultan llamativos nuestro resultados al considerar los suelos A, B y D en lo que respecta a la vegetación que en ella se encuentra. Nohrsdt (1983) señaló que en formaciones deciduas el ARA libre es superior al encontrado en *formaciones aciculifolias*, principalmente a causa del pH y de la degradabilidad de la hojarasca. Sin embargo en nuestro caso encontramos que los suelos que presentan mayor ARA (B y D) son suelos desarrollados sobre los que se asientan pinos y alisos respectivamente. Además los pH son marcadamente diferentes (4.30 en B y 7.13 en D). Otros parámetros que pueden incidir en estos efectos podrían estar en relación con una jerarquización del grado de incidencia de los factores abióticos. Así podemos apuntar un efecto inhibitor del ARA en el suelo A por el alto contenido en N (12.5 mg/g tierra) que como Rice y Paul (1971) han señalado incide en una reducción de la acción fijadora libre.

En el efecto de los exudados nodulares y radicales sobre la amonificación potencial, lo más destacable es la relación inversa existente entre concentración de los tratamientos y tasa de mineralización, en contra de lo que en principio podría pensarse pues como señalan Chae y Tabatabai (1986) la adición de materia orgánica (en nuestro caso exudados) debería tener un efecto activador sobre la amonificación. Para justificar estos resultados proponemos dos hipótesis:

(i) que el tratamiento T1 (en N y R) aporten suficiente cantidad de materia orgánica no nitrogenada de forma que los microorganismos mineralizantes la emplean como fuente energética, sin verse en la necesidad de utilizar para este fin el N orgánico mineralizable, que emplean como fuente de nitrógeno quedando

este inmovilizado. Las diferencias entre los exudados N y R no son significativas, lo que indica ausencia de variación en el tipo de materia orgánica liberada por ambos, en lo que respecta a su incidencia sobre este grupo de microorganismos. Estos datos sugieren una eficiente translocación de los compuestos orgánicos nitrogenados resultantes de la fijación de nitrógeno a través del aparato radical.

(ii) La presencia de un inhibidor específico del proceso. Este inhibidor puede ser un agente antimicrobiano específico que actúe en los tratamientos más concentrados.

De lo expuesto hasta aquí, consideramos que la hipótesis más ajustada a los resultados obtenidos y los datos bibliográficos es la (i). Podemos rechazar la (ii) fundamentalmente basándonos en la heterogeneidad de los microorganismos mineralizadores del nitrógeno. Son tres los aspectos fundamentales a la hora de argumentar la hipótesis (i): en primer lugar, al estudiar los controles con Asn, observamos una disminución significativa respecto al control con agua. Esto se debe a que en los primeros la disponibilidad de materia orgánica carbonada y nitrogenada fácilmente asimilable permite una metabolización e inmovilización acusada (Barbarika y Sikora, 1985) de modo semejante al que ocurre en los tratamientos más concentrados (T1). En este sentido es interesante hacer referencia al trabajo de Bakken (1990), acerca de la mineralización y el aumento de la mineralización / inmovilización de nitrógeno en la rizosfera.

Los resultados obtenidos en los cuatro suelos ensayados nos mostraban que la tasa más elevada de amonificación potencial se da en el suelo B (en torno a 1.5 veces superior a los otros suelos). Sin embargo las tendencias son semejantes en todos ellos. Un primer aspecto es el indiscutible efecto de la vegetación sobre la mineralización (Powers, 1990; Maldenoff, 1987 y Gökçeglu, 1988). En nuestro caso sería un efecto indirecto: los suelos empleados en los ensayos se estudian sin el efecto de la vegetación que soportaban, pero esos suelos han sufrido una serie de modificaciones causadas por dicha vegetación, que pueden afectar a la capacidad de mineralización. Así, el suelo B (de pinar) exhibe una tasa más elevada que las de suelos de frondosas (suelos A y D) o matorral (suelo C). Estas consideraciones y resultados coinciden con los de Mandeloff (1987). Es más, dicho autor señala que dichos efectos no están en relación con los períodos de caída de la hojarasca e implica una cierta especialización de los microorganismos amonificantes a las condiciones que imprime la vegetación.

A diferencia de lo detectado en el caso de los exudados N y R, en el caso de PSN y PN se observa un incremento de la actividad amonificante asociada al aumento de la concentración de los exudados, encontrándose en PN valores más altos. Aunque las diferencias entre los distintos tratamientos no son significativas hemos de reflexionar sobre las tendencias opuestas que se manifiestan respecto a N y R. Siguiendo la misma línea de razonamiento que en el caso del experimento planteado con los exudados N y R podemos pensar que la materia orgánica liberada por PN y PSN es mucho más rica en nitrógeno que la liberada en N y R, como así lo confirma la caracterización bioquímica de ambos tipos de exudados. En el caso de N y R la razón C/N es aproximadamente de 2 y en PN y PSN de hasta 20. Todo ello implicaría una mineralización obligada de la materia orgánica disponible para la obtención de energía por parte de la microflora heterótrofa, lo que no permite detectar el proceso de inmovilización. Esta apreciación nos indica la importancia de la relación entre el tipo de materia orgánica disponible y los procesos de mineralización e inmovilización (Barbarika y Sikora, 1985). Son muchos los autores que justifican el aumento de la tasa de mineralización como consecuencia del aporte de materia orgánica especialmente rica en nitrógeno, por ejemplo fertilizantes (Moorhead *et al.*, 1988), o más concretamente referido a los exudados radicales (Griffiths y Robinson, 1992).

En el estudio del efecto de los exudados N y R por un lado y de PSN y PN por otro, sobre la nitrificación, podemos destacar un hecho claro: en los dos grupos de exudados se observa un descenso de la actividad nitrificante al ensayarse exudados de menor concentración.

Es bien conocido desde hace tiempo el hecho de que la nitrificación en un suelo aumenta con la adición de nutrientes y del sustrato de la reacción (amonio), (Sahrawat, 1982). Sin embargo las comparaciones de los distintos grupos de exudados, los controles con agua y con amonio nos conducen a pensar que dado el aumento de la producción de nitrato bajo el efecto de T1 (N, PN y PSN) el efecto no solo se debe al sustrato. Normalmente no se considera la accesibilidad a la fuente de carbono orgánico como limitante de la nitrificación. No obstante Cresenci *et al.* (1988) señalan que al agregar glucosa se observa un incremento de la producción de CO<sub>2</sub> que activa la nitrificación de un modo indirecto. En nuestro caso hay un aporte de diferentes hidratos de carbono (entre los cuales está la glucosa) que podrían optimizar el potencial nitrificante.

Parece pues lógico pensar en una acción sinérgica de amonio y materia orgánica carbonada (en distintas formas) en los exudados (sin entrar a considerar otros posibles elementos). Recordemos que Lynch (1990) señala la

imposibilidad de considerar los efectos de un metabolito de un modo aislado en lo referente a sus efectos sobre los microorganismos edáficos.

Un segundo aspecto que resulta ineludible a la hora de relacionar las excretas radicales y la nitrificación es el de los inhibidores del proceso. En nuestro caso al comparar (en los dos bloques de ensayos) los tratamientos con diferentes concentraciones y los respectivos controles con agua, se puede rechazar la existencia de cualquier efecto inhibitor. Autores desde Theron (1959) hasta Rice (1984) señalan que el efecto inhibitor se da en la rizosfera y suelo libre de zonas con vegetación. Según Rice y Pancholy (1972, 1974) la causa última de esta inhibición serían los compuestos fenólicos exudados por las raíces. En función de esta hipótesis, en PN y PSN no se aprecia efecto dada la relación que existe entre la lignificación y por lo tanto la riqueza en compuestos polifenólicos de los tejidos en crecimiento secundario. Esto es así: lejos de inhibirse el proceso los exudados promueven un incremento de la nitrificación fundamentalmente debido al aporte del sustrato de la reacción y materia orgánica carbonada, como ya señalábamos arriba. Revisando la bibliografía a este respecto podemos señalar cuatro puntos que respaldan la hipótesis opuesta a Rice y Pancholy:

(i) Molina y Rovira (1963) encuentran que la baja tasa de producción de nitrato en medios con raíces de alfalfa y maíz es debida más a la inmovilización del nitrógeno por los heterótrofos al crecer, que a la inhibición específica de la nitrificación por los exudados. A este respecto, recordemos las consideraciones hechas al tratar los resultados de amonificación.

(ii) Bohtool et al. (1977) estudiando efectos de taninos y derivados tanínicos sobre los nitrificantes no encontraron inhibición específica alguna.

(iii) McCarty y Bremner (1986) estudiaron el efecto de ácidos fenólicos en diferentes concentraciones, encontrando que no afectaban a la nitrificación.

(iv) Bermúdez de Castro et al. (1984) Señalaron que *Alnus glutinosa* además de no inhibir los microorganismos nitrificantes rizosféricos, incrementa su proliferación.

A la vista de todos estos estudios parece que se puede estar especulando sobre aspectos que tengan muy diferentes comportamientos, según las especies vegetales que se desarrollen sobre el suelo estudiado, pero resulta evidente que el efecto (ya señalado por otros autores) inhibitor de las plantas diazotrofas sobre la nitrificación no se debe a los exudados radicales.



Como ya se ha señalado anteriormente, en el caso de la actividad **desnitrificante** en presencia de los exudados R, PN y PSN, encontramos un incremento de la actividad con respecto al control con agua. Así mismo aumenta la producción de  $N_2O$  con la concentración de los exudados. Sin embargo, en los exudados N el efecto es el contrario. Podemos analizar tres posibilidades que expliquen este fenómeno:

(i) la presencia de inhibidores específicos del proceso, como los que se han descrito en el proceso de nitrificación (Rice y Pancholy, 1972, 1974) o amonificación (Sprent, 1990). La presencia de inhibidores de la desnitrificación suele asociarse a un mecanismo por parte de la planta encaminado a evitar la pérdida de nitrógeno del sistema. Sin embargo esto entra en conflicto con nuestras observaciones ya que, en los exudados R no se refleja este efecto, sino el contrario y un mecanismo como el descrito sería más previsible en PSN, que necesitan del nitrógeno mineral del suelo, que en PN las cuales han resuelto el problema de la heterotrofia respecto a dicho nutriente; además la inhibición del proceso no se detecta cuando el experimento se plantea con vegetales vivos (PN y PSN). Sin embargo debemos tener en cuenta que las condiciones de exudación en R y N, (estrés hídrico y de fotosintatos) o PN y PSN (en cultivo hidropónico).

(ii) Bajo condiciones de anaerobiosis (o por lo menos de microaerobiosis) el nitrato puede reducirse tanto a óxidos de nitrógeno o nitrógeno molecular (desnitrificación) como a amonio (reducción desasimilatoria del nitrato, RDN). El hecho de que el nitrato de un suelo siga una de las dos rutas no está suficientemente claro en la actualidad. Sin embargo Tiedje *et al.* (1982) ha señalado la relación entre este fenómeno y la existencia de un exceso de poder reductor en el suelo o cuando la concentración de materia orgánica carbonada es alta y son escasos los aceptores de electrones (De Cantazaro *et al.*, 1987). Por otro lado Scott-Smith (1982) señala que bajas concentraciones de nitratos y gran contenido de glucosa se optimizan la ruta RDN mientras que alto contenido de nitrato y bajas concentraciones de glucosa dan lugar a la ruta de desnitrificación. Si esto fuese así, habría que considerar, que en el caso hipotético de que se diese la RDN habría un incremento del amonio en el medio. El incremento de amonio en el medio se ve reflejado en nuestros resultados de amonificación, como ya señalamos en el caso de los exudados N, se observa un descenso de la tasa de amonificación en el tratamiento T1 respecto a los menos concentrados en los que podría reproducirse una situación apropiada para que se verifique la RDN.

Estas hipótesis que estamos analizando han de ser tomadas con las debidas precauciones: en primer lugar (y considerando meramente el proceso de amonificación) porque el aumento de amonio se produce tanto en los exudados R como N. En segundo lugar porque considerar aisladamente los procesos puede conducir a error. Ténganse en cuenta que con el procedimiento de medición del potencial de desnitrificación está bloqueado el proceso de nitrificación (Yoshinari y Knowles, 1976), cosa que no ocurre en la amonificación.

(iii) La tercera y última posibilidad para justificar nuestros resultados estaría relacionada con la disponibilidad de sustrato orgánico oxidable. Bajo este punto de vista se podrían justificar los resultados obtenidos en los tratamientos menos concentrados, tanto atendiendo al efecto del contenido en materia orgánica (Rolston *et al.*, 1976) como a la biodisponibilidad de nitrato. Estos factores pueden explicar los resultados encontrados en los exudados R, de PN y PSN, pero las notorias diferencias existentes entre R y N nos permiten indicar que ese factor no es el único que afecta al proceso.

Por otra parte, consideramos las distintas respuestas de los diferentes suelos ensayados. En los dos grupos de tratamientos (N y R; PN y PSN) las tasas de desnitrificación decrecen A > B > C y D. Las características intrínsecas de los suelos parecen las responsables de estas diferencias. Letey *et al.* (1980) señala como una de las características que más afectan a la desnitrificación los tratamientos agronómicos a los que está sujeto un suelo. Otro indudable aspecto es la incidencia de la vegetación (Stefansen, 1973). Aquí nuevamente tenemos que reiterar, que aunque en nuestros experimentos no contamos con el efecto directo y continuo de la vegetación sobre el suelo estos proceden de lugares en los que este efecto se ha verificado durante largo tiempo imprimiendo unas características determinadas a dichos suelos.

Como señalamos los tratamientos con exudados N, R, PN y PSN, muestran unas tasas de producción de CO<sub>2</sub> crecientes al aumentar la concentración de exudados en los distintos casos. La forma de evolución es semejante en los cuatro suelos ensayados, pero cuantitativamente es muy diferente.

Las diferencias entre las distintas concentraciones de exudados esta determinada por el aporte de materia orgánica, tanto carbonada como nitrogenada. Esto ya ha sido señalado por muchos autores (Alexander, 1961; Olsen, 1954). Los diferentes tratamientos y controles muestran con claridad el efecto positivo que ejercen sobre la microflora total, si bien pueden existir, como ya hemos señalado, inhibiciones o activaciones de determinados grupos.

Un aspecto que quizá sea más interesante considerar detenidamente es que, en cada tipo de suelo, los distintos tratamientos muestran importantes diferencias cuantitativas. Estas han de responder a tres factores:

(i) el número de microorganismos presentes en los distintos suelos.

(ii) La composición cenótica de las poblaciones edáficas. En este sentido Gaur et al. (1971), estudia la producción de  $\text{CO}_2$  por efecto de la adición de distintas fuentes de materia orgánica a un suelo. Como conclusión del trabajo se encuentra que la producción de  $\text{CO}_2$  esta en relación no solo con la fuente de materia orgánica sino también con los microorganismos edáficos dominantes (bacterias, hongos, actinomicetes, Azotobacter...)

(iii) Tras la adición de materia orgánica en el suelo la producción de  $\text{CO}_2$  no solo depende de aspectos biológicos del suelo sino también de aspectos fisicoquímicos.

## **6. RESULTADOS DE LAS EXPERIENCIAS REALIZADAS EN EL SENTIDO SUELO-PLANTA**

Siguiendo el esquema de trabajo descrito en el apartado 1.4., se ha procedido a recolectar bacterias que en condiciones naturales aparecen en la rizosfera de ejemplares de Alnus glutinosa establecidos, desde hace algo más de 20 años, en San Martín de Valdeiglesias.

El planteamiento de este trabajo aprovecha los procesos de selección naturales. La comunidad rizosférica presenta una estructura compleja, constituyéndose a través de interacciones entre los componentes bióticos y abióticos del sistema, hasta alcanzar un estado de equilibrio dinámico.

Dichas comunidades están sometidas a las fluctuaciones climáticas que tienen una considerable influencia sobre el metabolismo bacteriano y la fisiología de la planta, por lo cual se realiza el muestreo durante un período de tiempo que recoge el ciclo vegetativo del aliso.

Una vez aisladas y determinadas a nivel de género las bacterias más representativas de la rizosfera de A. glutinosa en la zona señalada, se caracterizaron subgenéricamente y se encuadraron en el ciclo del nitrógeno según su actividad fisiológica en el mismo. Por último se determinó su efecto sobre la germinación y desarrollo de A. glutinosa en condiciones de laboratorio.

A continuación se exponen los resultados obtenidos en las experiencias realizadas según el plan de trabajo expuesto.

### **6.1. Análisis fisicoquímicos de los suelos rizosféricos**

En los mismos suelos rizosféricos en los que se realiza el muestreo microbiológico cuyos resultados se exponen en 6.2, se analizaron las variables fisicoquímicas que nos indican con carácter general las características del substrato edáfico en el cual se desarrollan dichos microorganismos. Los resultados de este análisis se exponen en la Tabla 6.I y la Figura 6.1.

Todos ellos corresponden a la media aritmética de tres réplicas por muestra y tres medidas por réplica.

Tabla 6.I. Caracterización de los suelos. Variables fisicoquímicas. Unidades: C orgánico (%); N-amonio y N-nitrato ( $\mu\text{g/g}$  suelo). Junto a cada resultado aparece el error estándar.

	OTOÑO	INVIERNO	PRIMAVERA	VERANO
pH	6.51 $\pm$ 0.013	6.76 $\pm$ 0.145	6.46 $\pm$ 0.029	7.09 $\pm$ 0.102
C orgánico	3.04 $\pm$ 0.209	6.04 $\pm$ 0.383	6.09 $\pm$ 1.358	4.70 $\pm$ 0.344
N amonio	4.89 $\pm$ 0.633	25.12 $\pm$ 3.808	26.24 $\pm$ 4.765	8.64 $\pm$ 2.937
N nitrato	10.73 $\pm$ 2.507	15.21 $\pm$ 2.783	13.37 $\pm$ 3.121	38.55 $\pm$ 8.696

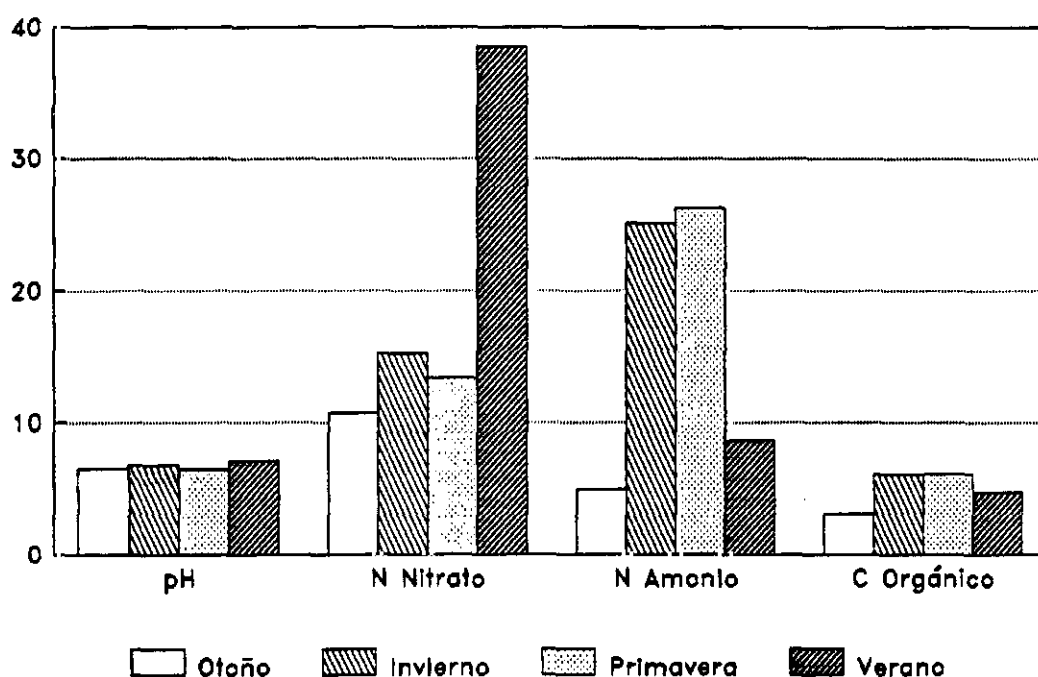


Figura 6.1. Resultados de los análisis fisicoquímicos de los suelos

Como se puede apreciar en todas las muestras el pH es ligeramente ácido salvo en verano en que se alcanza un valor prácticamente neutro. Los pH no presentan grandes variaciones a lo largo del año, oscilan entre 6.46, en primavera, y 7.09 en verano, siendo ésta la estación con el pH mayor.

El porcentaje de carbono orgánico alcanza los valores más altos durante los meses de invierno y primavera, entre los cuales no existen diferencias notables, 6.04 y 6.09, descendiendo en verano, 4.70, y alcanzando los valores más bajos en otoño, 3.04.

El nitrógeno amonio presenta unas variaciones estacionales similares a las del carbono orgánico. Los valores más altos aparecen en invierno y primavera, descendiendo en verano y otoño. Las concentraciones oscilan entre 4.89  $\mu\text{g NH}_4^+/\text{g suelo}$  (otoño) y 26.24  $\mu\text{g NH}_4^+/\text{g suelo}$  (primavera).

El nitrógeno nitrato aumenta considerablemente en verano siendo ésta la estación en la que se detectan las concentraciones máximas. En esta época del año se obtienen valores superiores en más de un 100% a la estación con concentraciones inmediatamente inferiores (invierno). En el resto los valores oscilan entre 15.21  $\mu\text{g NO}_3^-/\text{g suelo}$ , (invierno) y 10.73  $\mu\text{g NO}_3^-/\text{g suelo}$  (otoño).

La textura y la capacidad de retención máxima se midió en otoño. La textura de las tres réplicas, de las que se efectuaron tres medidas, resultó ser franco arenosa, con una capacidad de retención máxima de 0.46 ml/g de suelo.

## **6.2. Géneros bacterianos encontrados y frecuencia de los mismos**

Los géneros bacterianos a los que pertenecían las bacterias aisladas a partir de las suspensiones diluciones de suelo, se determinaron siguiendo el esquema diagnóstico de Acero et al. (1994). Los resultados se muestran en la Tabla 6.II.

Tabla 6.II. Frecuencia (%) de los géneros bacterianos en cada momento de muestreo. 1: muestras recogidas al inicio de la estación. 2: muestras recogidas a mediados de la estación.

	OTOÑO		INVIERNO		PRIMAVERA		VERANO		Frecuencia media anual (%)
	1	2	1	2	1	2	1	2	
<u>Bacillus</u>	38	38	36	37	22	16	15	17	27.38
<u>Streptomyces</u>	10	9	8	11	7	12	10	10	9.25
<u>Pseudomonas</u>	6	12	17	14	21	34	36	26	20.75
<u>Erwinia</u>	—	2	4	3	6	8	9	3	4.38
<u>Agrobacterium</u>	—	1	—	2	5	6	6	2	2.75
<u>Escherichia</u>	—	—	2	1	7	6	2	—	2.25
<u>Micrococcus</u>	7	6	7	5	4	6	4	6	5.83
<u>Sporosarcina</u>	6	3	4	6	3	3	4	5	5.25
<u>Serratia</u>	—	1	—	—	2	5	7	2	2.12
Difteroides	10	5	2	3	5	3	6	7	5.12
Bacilos (+)									
no esporulados	17	9	10	4	10	1	1	10	7.75
Cocos (+)	4	6	7	1	3	—	—	5	3.25
Cocos (—)	1	3	3	3	—	—	—	2	1.5

La Figura 6.2 muestra las frecuencias bacterianas de cada género durante el año. Podemos observar como las bacterias del género Bacillus son las más abundantes (27.38%), junto con las del género Pseudomonas (20.75%). Las diferencias de estos dos grupos con el resto son muy acusadas. En cuanto a los demás grupos podemos señalar que Streptomyces constituye 9.25% del total de colonias censadas, mientras que las restantes oscilan entre el 2.12% en el caso de Serratia y el 5.83% de Micrococcus.



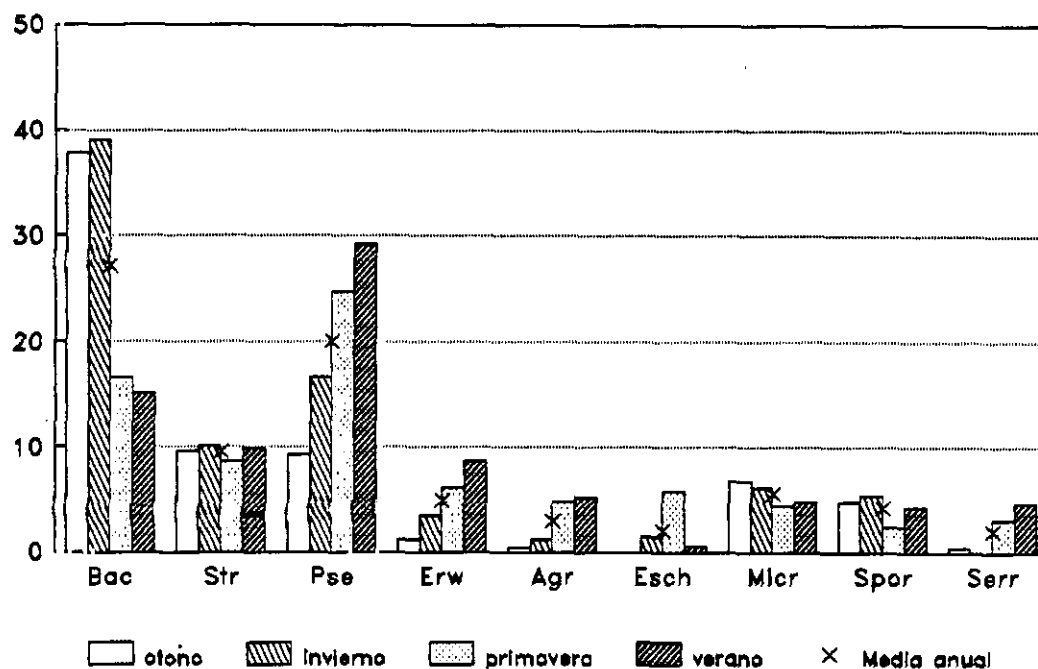


Figura 6.2. % de los géneros bacterianos (media de ambos muestreos) en cada estación.

En la Figura 6.3, se observa la frecuencia de los tres géneros más abundantes a lo largo del año, Bacillus, Pseudomonas y Streptomyces. Bacillus, presenta una mayor abundancia en otoño e invierno descendiendo en primavera, y manteniéndose en verano. La frecuencia de Pseudomonas va aumentando desde otoño hasta alcanzar los valores más altos en verano. Streptomyces, presenta escasas variaciones, disminuyendo levemente su porcentaje en primavera.

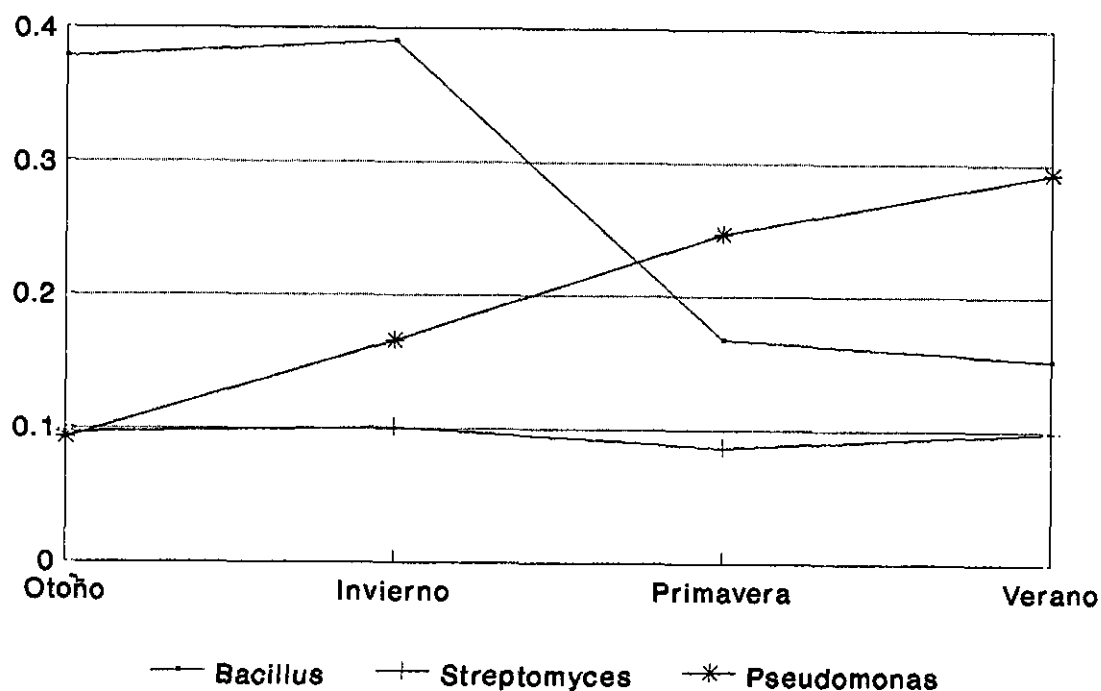


Figura 6.3. Frecuencia de los géneros bacterianos más abundantes (media de ambos muestreos) encontrados en cada estación.

La Figura 6.4 muestra la frecuencia de los géneros bacterianos con menor abundancia a lo largo del año. Estos géneros presentan considerables variaciones aunque el rango en el que se produce dicha variación es menor. Se observa que Erwinia aumenta su porcentaje en otoño alcanzando las frecuencias más altas en verano, sin embargo Escherichia aumenta de otoño a primavera, sufriendo una considerable disminución en verano. Micrococcus y Sporosarcina se comportan de modo similar disminuyendo su porcentaje en primavera para volver a aumentar en verano, y alcanzar las mayores frecuencias en otoño e invierno. Agrobacterium y Serratia, evolucionan de forma similar, en otoño e invierno presentan la frecuencia más baja, densidad que va incrementando hasta primavera y se mantiene con un ligero aumento en verano.

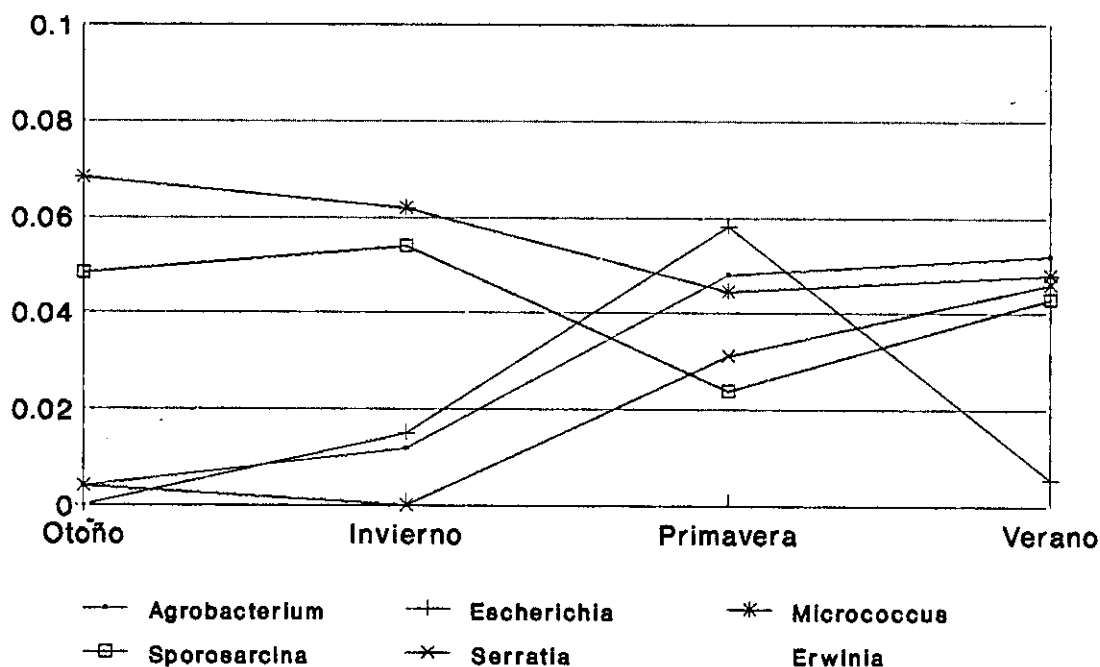


Figura 6.4. Frecuencia de los géneros bacterianos menos abundantes (media de ambos muestreos) encontrados en cada estación.

#### 6.2.1. Caracterización subgenérica de Bacillus y Pseudomonas

En las tablas 6.III y 6.IV se muestran los resultados de la caracterización subgenérica de las bacterias mayoritarias de cada estación efectuados siguiendo el procedimiento descrito en 3.1.3. En la figura 6.5. se representa el número de bacterias pertenecientes a cada uno de los grupos resultantes de dicha caracterización.

Como se puede observar las bacterias del género Bacillus pertenecen en su mayor parte a los grupos VI (47 cepas) y VII (49 cepas), si bien se detectan algunas integradas en I (3 cepas), IV (16 cepas) y V (5 cepas). En cuanto al género Pseudomonas la mayoría exhiben un resultado al kit Api-10: 2422, que hemos denominado tipo A, con un total de 31 cepas; además se detectaron 3 del tipo B (Api-10: 0406) y 2 cepas del tipo C (Api-10: 2002).

**Tabla 6.III. Caracterización subgenérica de las bacterias del género Bacillus en otoño, invierno y primavera.**

Cada bacteria se denomina con un código formado con la inicial de la estación en que fue recolectada (P, primavera; V, verano; O, otoño; I, invierno), la inicial del género al que pertenece (B, Bacillus; P, Pseudomonas) y el número asignado a cada cepa. Esta nomenclatura se conserva en todo el trabajo.

**OTONO**

Bac	Catsa	F. glu	F. Ara	Form. Cit.	Grupo
O.B.1	+	+	+	-	VII
O.B.2	+	+	+	+	VI
O.B.3	+	+	+	-	VII
O.B.4	+	+	-	-	V
O.B.5	+	+	-	-	V
O.B.6	+	-	-	-	I
O.B.7	+	+	-	+	IV
O.B.8	+	+	+	-	VII
O.B.9	+	+	-	-	VII
O.B.10	+	+	+	-	VII
O.B.11	+	+	+	+	VI
O.B.12	+	+	+	-	VII
O.B.13	+	+	+	-	VII
O.B.14	+	-	-	-	I
O.B.15	+	+	+	+	VI
O.B.16	+	+	+	-	VII
O.B.17	+	+	+	+	VI
O.B.18	+	+	+	+	VI
O.B.19	+	+	-	+	IV
O.B.20	+	+	+	+	VI
O.B.21	+	+	+	+	VI
O.B.22	+	+	+	-	VII
O.B.23	+	+	-	-	V
O.B.24	+	+	+	-	VII
O.B.25	+	+	+	-	VII
O.B.26	+	+	+	+	VI
O.B.27	+	+	+	+	VI
O.B.28	+	+	+	+	VI
O.B.29	+	+	+	+	VI
O.B.30	+	+	+	+	VI
O.B.31	+	+	+	+	VI
O.B.32	+	+	+	+	VI
O.B.33	+	+	+	-	VII
O.B.34	+	+	+	+	VI
O.B.35	+	+	+	+	VI
O.B.36	+	+	+	+	VI
O.B.37	+	+	+	-	VII
O.B.38	+	+	+	-	VII
O.B.39	+	+	+	-	VII
O.B.40	+	+	+	-	VII
O.B.41	+	+	+	+	VI
O.B.42	+	+	+	-	VII
O.B.43	+	+	+	-	VII
O.B.44	+	+	+	-	VII
O.B.45	+	+	-	+	IV
O.B.46	+	+	-	+	IV
O.B.47	+	+	-	+	IV

**INVIERNO**

<b>Bac</b>	<b>Catsa</b>	<b>F. glu</b>	<b>F. Ara</b>	<b>Form. Cit.</b>	<b>Grupo</b>
I.B.1	+	+	+	-	VII
I.B.2	+	+	+	+	VI
I.B.3	+	+	+	+	VI
I.B.4	+	+	-	+	IV
I.B.5	+	+	+	+	VI
I.B.6	+	+	-	+	IV
I.B.7	+	+	-	+	IV
I.B.8	+	+	+	-	VII
I.B.9	+	+	+	-	VII
I.B.10	+	+	+	-	VII
I.B.11	+	+	+	-	VII
I.B.12	+	+	+	+	VI
I.B.13	+	+	+	-	VII
I.B.14	+	+	+	+	VI
I.B.15	+	+	+	-	VII
I.B.16	+	+	-	+	IV
I.B.17	+	+	+	-	VII
I.B.18	+	+	+	-	VII
I.B.19	+	+	+	+	VI
I.B.20	+	+	+	+	VI
I.B.21	+	+	-	+	IV
I.B.22	+	+	+	-	VII
I.B.23	+	+	+	-	VII
I.B.24	+	+	-	+	IV
I.B.25	+	+	+	-	VII
I.B.26	+	+	+	+	VI
I.B.27	+	+	+	+	VI
I.B.28	+	+	+	-	VII
I.B.29	+	+	+	+	VI
I.B.30	+	+	+	+	VI
I.B.31	+	+	+	+	VI
I.B.32	+	+	+	-	VII
I.B.33	+	+	+	+	VI
I.B.34	+	+	+	+	VI
I.B.35	+	+	+	-	VII
I.B.36	+	+	+	+	VI
I.B.37	+	+	+	+	VI
I.B.38	+	+	+	+	VI
I.B.39	+	+	+	-	VII
I.B.40	+	+	-	+	IV
I.B.41	+	-	-	-	I
I.B.42	+	+	+	+	VI
I.B.43	+	+	+	+	VI
I.B.44	+	+	+	-	VII
I.B.45	+	+	+	+	VI
I.B.46	+	+	+	+	VI
I.B.47	+	+	+	-	VII
I.B.48	+	+	+	-	VII
I.B.49	+	+	+	-	VII
I.B.50	+	+	+	-	VII

**PRIMAVERA**

Bac	Catsa	F. glu	F. Ara	Form. Cit.	Grupo
P.B.1	+	+	+	+	VI
P.B.2	+	+	+	-	VII
P.B.3	+	+	+	+	VI
P.B.4	+	+	+	+	VI
P.B.5	+	+	+	-	VII
P.B.6	+	+	+	-	VII
P.B.7	+	+	+	-	VII
P.B.8	+	+	+	+	VI
P.B.9	+	+	+	-	VII
P.B.10	+	+	+	+	VI
P.B.11	+	+	+	-	VII
P.B.12	+	+	+	+	VI
P.B.13	+	+	+	-	VII
P.B.14	+	+	-	+	IV
P.B.15	+	+	+	+	VI
P.B.16	+	+	+	-	VII
P.B.17	+	+	+	-	VII
P.B.18	+	+	-	-	V

Abreviaturas: Catsa: catalasa; F.glu: fermentación de glucosa; F. ara: fermentación de arabinosa; Form. Cit: producción de citrato.

**Tabla 6.IV. Caracterización subgenérica de las bacterias del género Pseudomonas en primavera y verano.**

**PRIMAVERA**

Bac	Api-10	Grupo
P.P.1	2422	A
P.P.2	2422	A
P.P.3	2422	A
P.P.4	0406	B
P.P.5	2422	A
P.P.6	2422	A
P.P.7	2422	A
P.P.8	2422	A
P.P.9	2422	A
P.P.10	2422	A
P.P.11	2422	A
P.P.12	2422	A
P.P.13	2422	A
P.P.14	2422	A
P.P.15	2422	A
P.P.16	2422	A
P.P.17	2422	A
P.P.18	2422	A
P.P.19	2422	A
P.P.20	2002	C
P.P.21	2422	A
P.P.22	2422	A

**PRIMAVERA** (continuación)

Bac	Api-10	Grupo
P.P.23	2422	A
P.P.24	2422	A
P.P.25	2422	A
P.P.26	2422	A
P.P.27	2422	A

**VERANO**

Bac	Api-10	Grupo
V.P.1	2422	A
V.P.2	2422	A
V.P.3	2422	A
V.P.4	2422	A
V.P.5	2422	A
V.P.6	2422	A
V.P.7	2422	A
V.P.8	0406	B
V.P.9	2422	A
V.P.10	2422	A
V.P.11	2422	A
V.P.12	2422	A
V.P.13	2422	A
V.P.14	0406	B
V.P.15	2422	A
V.P.16	2422	A
V.P.17	2422	A
V.P.18	2422	A
V.P.19	2002	C
V.P.20	2422	A
V.P.21	2422	A
V.P.22	2422	A
V.P.23	2422	A
V.P.24	2422	A
V.P.25	2422	A
V.P.26	2422	A

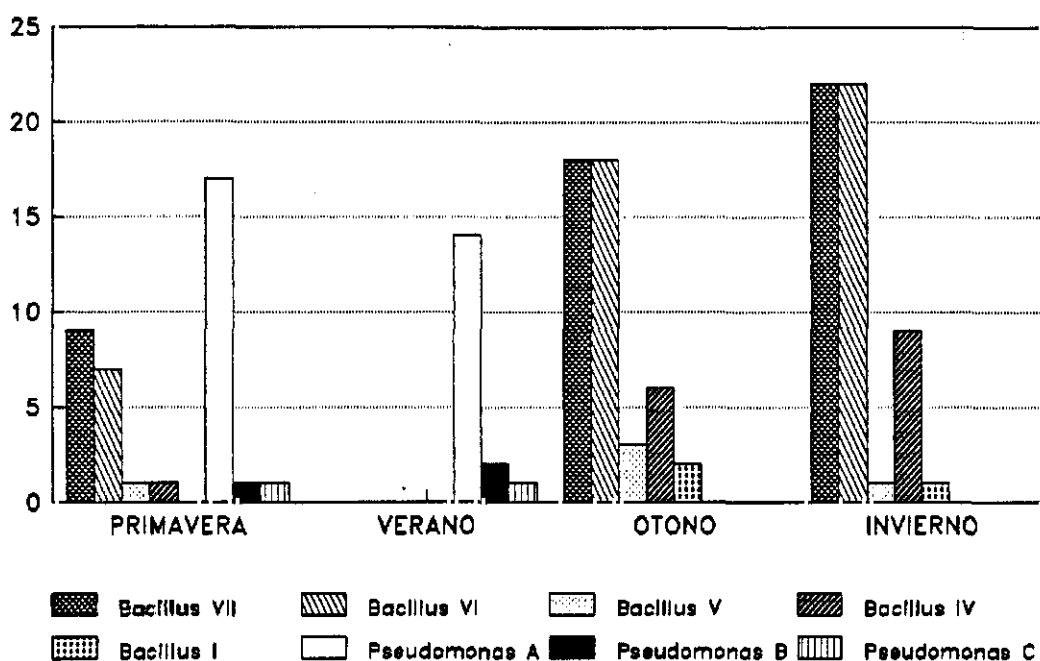


Figura 6.5. Representación del número de bacterias pertenecientes a cada uno de los grupos subgenéricos de Bacillus y Pseudomonas a lo largo de las estaciones del año.

#### 6.2.2. Ciclo del Nitrógeno

Las Tablas 6.V, 6.VI, 6.VII y 6.VIII muestran los resultados de los análisis microbiológicos efectuados sobre las bacterias de los géneros mayoritarios de cada estación, realizados con el objeto de conocer el papel de cada una de ellas en el ciclo del nitrógeno.

Todas las bacterias resultaron ser amonificantes y ninguna nitrificante nítrica o nitrosa, como tampoco aparecieron bacterias capaces de fijar nitrógeno en anaerobiosis. El mayor porcentaje de bacterias desnitrificantes aparece en primavera, y en otoño el menor. En verano encontramos los porcentajes más altos de bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias, seguido de invierno, otoño y primavera respectivamente.



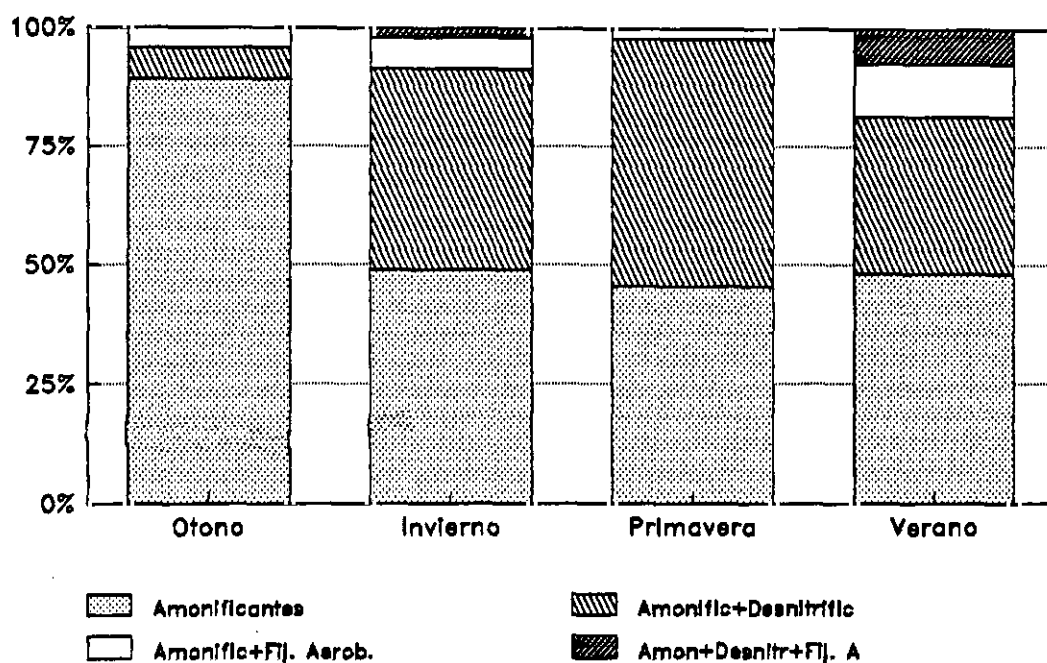


Figura 6.6. Porcentaje de bacterias de los géneros mayoritarios de cada estación que pertenece a cada grupo funcional del ciclo del nitrógeno.

Como se puede observar en la Figura 6.6, la mayor parte de las bacterias de otoño son únicamente amonificantes (89.36%). Este tipo de bacterias siguen siendo mayoritarias en invierno y en verano, aunque el porcentaje desciende de forma apreciable (48.94% y 48.15% respectivamente). Quizá este dato sea uno de los más sobresalientes de los encontrados en estos análisis, ya que la diferencia entre este grupo y los restantes es considerable.

Esto parece indicar que la mayor parte de la microflora bacteriana se encuentra realizando actividades heterótrofas, y el oxígeno no parece actuar como limitante en los procesos oxidativos. En primavera son mayoritarias las bacterias que muestran tanto actividad amonificante como desnitrificante, de las cuales el 69.57% son Pseudomonas, y el resto Bacillus.

El porcentaje de bacterias amonificantes y desnitrificantes va aumentando desde otoño, donde alcanza los valores más bajos, hasta primavera, en verano vuelve a disminuir.

Es importante el hecho de que en invierno, primavera y verano esta situación se transforma considerablemente de forma que se equilibra el número de bacterias estrictamente amonificantes con las que además de esta actividad son capaces de desnitrificar por completo el  $\text{NO}_3^-$ . Esto indica un cambio con respecto a los hechos antes comentados: pueden aparecer microhábitats en los que el oxígeno actúa como limitante (sobre todo en invierno y primavera) y el poder reductor se canalice hacia la reducción de  $\text{NO}_3^-$ .

En cuanto a las bacterias fijadoras de nitrógeno aerobias y amonificantes, los mayores porcentajes aparecen en verano, seguido del invierno y alcanzando los valores mínimos en primavera (2.27% correspondiente al género Bacillus en su totalidad). Por último, sólo en dos estaciones, verano e invierno aparecen bacterias capaces de amonificar, desnitrificar y fijar nitrógeno en condiciones aerobias. El porcentaje es sensiblemente mayor en verano.

En las Tablas 6.V, 6.VI, 6.VII y 6.VIII se utilizan las siguientes abreviaturas:

Bac	Bacteria
F.aerobia	Fijación aerobia
F.anaerob	Fijación anaerobia
Nítricos	Nitrificantes nítricos
Nitrosos	Nitrificantes nitrosos
Amonific	Amonificantes
Desnitr	Desnitrificantes

Tabla 6.V. Actividades del ciclo del nitrógeno encontradas en las bacterias pertenecientes al género Bacillus en otoño.

Bac	F.aerobia	F.anaerob	Nítricos	Nitrosos	Amonific	Desnitr
O.B.1	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.2	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + +
O.B.3	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.4	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + +
O.B.5	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.6	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.7	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.8	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.9	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.10	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.11	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.12	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.13	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.14	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.15	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.16	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.17	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.18	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - +
O.B.19	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.20	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.21	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.22	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.23	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.24	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.25	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.26	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.27	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.28	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.29	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.30	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.31	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.32	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.33	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.34	+ + +	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.35	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.36	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.37	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.38	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.39	- + +	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.40	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.41	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.42	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.43	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.44	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.45	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.46	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
O.B.47	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -

Tabla 6.VI. Actividades del ciclo del nitrógeno encontradas en las bacterias pertenecientes al género Bacillus en invierno.

Bac	F.aerobia	F.anaerob	Nítricos	Nitrosos	Amonific	Desnitr
I.B.1	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- + +
I.B.2	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + +
I.B.3	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + -
I.B.4	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + -
I.B.5	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + +
I.B.6	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
I.B.7	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ - +
I.B.8	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
I.B.9	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- + -
I.B.10	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
I.B.11	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - +
I.B.12	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
I.B.13	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + +
I.B.14	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
I.B.15	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
I.B.16	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
I.B.17	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
I.B.18	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
I.B.19	- - +	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + -
I.B.20	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
I.B.21	- - +	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
I.B.22	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
I.B.23	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- + -
I.B.24	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
I.B.25	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
I.B.26	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
I.B.27	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
I.B.28	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
I.B.29	- + +	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ - -
I.B.30	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + +
I.B.31	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
I.B.32	- + -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
I.B.33	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
I.B.34	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
I.B.35	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
I.B.36	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
I.B.37	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
I.B.38	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ - -
I.B.39	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ - -
I.B.40	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
I.B.41	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ - -
I.B.42	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
I.B.43	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + +
I.B.44	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + +
I.B.45	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + +
I.B.46	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + +
I.B.47	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + +
I.B.48	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
I.B.49	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ - -
I.B.50	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ - -

Tabla 6.VII. Actividades del ciclo del nitrógeno encontradas en las bacterias pertenecientes al género Bacillus y Pseudomonas en primavera.

Bac	F.aerobia	F.anaerob	Nítricos	Nitrosos	Amonific	Desnitr
P.B.1	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ - -
P.B.2	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
P.B.3	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
P.B.4	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ - -
P.B.5	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
P.B.6	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
P.B.7	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + -
P.B.8	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + -
P.B.9	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + +
P.B.10	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + +
P.B.11	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
P.B.12	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
P.B.13	- - +	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
P.B.14	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
P.B.15	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + +
P.B.16	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + -
P.B.17	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + -
P.B.18	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ - -
P.P.1	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + -
P.P.2	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + +
P.P.3	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
P.P.4	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + -
P.P.5	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + -
P.P.6	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + -
P.P.7	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
P.P.8	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
P.P.9	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ - -
P.P.10	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ - -
P.P.11	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ - -
P.P.12	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + +
P.P.13	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ - -
P.P.14	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
P.P.15	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ - -
P.P.16	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
P.P.17	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
P.P.18	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
P.P.19	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
P.P.20	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
P.P.21	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
P.P.22	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ - -
P.P.23	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ - -
P.P.24	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
P.P.25	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
P.P.26	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
P.P.27	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -

Tabla 6.VIII. Actividades del ciclo del nitrógeno encontradas en las bacterias pertenecientes al género Pseudomonas en verano.

Bac	F.aerobia	F.anaerob	Nítricos	Nitrosos	Amonific	Desnitr
V.P.1	+ - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
V.P.2	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
V.P.3	+ - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ - -
V.P.4	+ + -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
V.P.5	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
V.P.6	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ - -
V.P.7	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ - -
V.P.8	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ - -
V.P.9	+ + +	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ - -
V.P.10	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
V.P.11	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
V.P.12	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
V.P.13	+ + -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
V.P.14	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + +
V.P.15	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
V.P.16	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
V.P.17	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ - -
V.P.18	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + +
V.P.19	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + +
V.P.20	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
V.P.21	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
V.P.22	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
V.P.23	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -
V.P.24	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ + -
V.P.25	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	+ - -
V.P.26	- - -	- - -	- - -	- - -	+ + +	- - -

### 6.2.3. Análisis de Componentes Principales de la variación estacional de géneros

El Análisis de Componentes Principales (ACP) se ha realizado utilizando el número de colonias de cada género en cada momento de muestreo expresado en %, sobre una matriz de 9 variables x 8 observaciones. Este análisis permite representar las muestras en un espacio definido por dos ejes principales que absorben un porcentaje de varianza del 63.11% y 17.35% respectivamente (Tabla 6.IX) y por tanto la ordenación se refiere a estos dos ejes principales, que absorben entre ambos un 80.46% de la varianza.

Los factores de carga de las 9 variables en los dos ejes se exponen en la Tabla 6.X. Las variables de mayor peso en la dispersión de las muestras en el eje principal I son Bacillus, Micrococcus y Sporosarcina, hacia el extremo positivo y Erwinia, Agrobacterium y Serratia, hacia el negativo. En el eje II las variables de más influencia son Streptomyces y Escherichia (hacia el extremo positivo).

La Figura 6.7 nos muestra la ordenación de las variables según los factores de carga. Podemos observar como los géneros Bacillus, Micrococcus y Sporosarcina aparecen aislados del resto, en valores altos y positivos del eje I y bajos y positivos del eje II. Pseudomonas, Agrobacterium, Erwinia, Serratia y Escherichia aparecen formando un grupo situado en los valores altos y negativos del eje I. Streptomyces se encuentra aislada del resto en los valores positivos del eje I y en los valores positivos y altos del eje II.

Como se observa en la Figura 6.8 existe una clara variación entre los meses de otoño e invierno, que aparecen en los valores positivos del eje I y los de primavera y verano, que aparecen en los valores negativos del primer eje. Las dos muestras de otoño y la primera de invierno aparecen en el extremo negativo del eje II, mientras que la segunda muestra de invierno aparece en el extremo positivo del segundo eje. Las muestras de primavera aparecen separadas de las de verano, encontrándose esas últimas hacia el extremo negativo del segundo eje y las de primavera hacia el extremo positivo.

Tabla 6.IX. Porcentaje de absorción de varianza por los ejes.

EJE	% Varianza	% Acumulado
1	63.11222	63.11222
2	17.34798	80.46019

Tabla 6.X. Factores de carga de las variables en los dos primeros ejes.

Variable	EJE 1	EJE 2
<u>Bacillus</u>	0.365154	0.229431
<u>Streptomyces</u>	0.136136	0.679382
<u>Pseudomonas</u>	-0.341484	0.346276
<u>Erwinia</u>	-0.390871	0.076705
<u>Agrobacterium</u>	-0.383786	0.201685
<u>Escherichia</u>	-0.240164	0.437794
<u>Micrococcus</u>	0.329035	0.278944
<u>Sporosarcina</u>	0.32824	0.221843
<u>Serratia</u>	-0.397193	0.025406

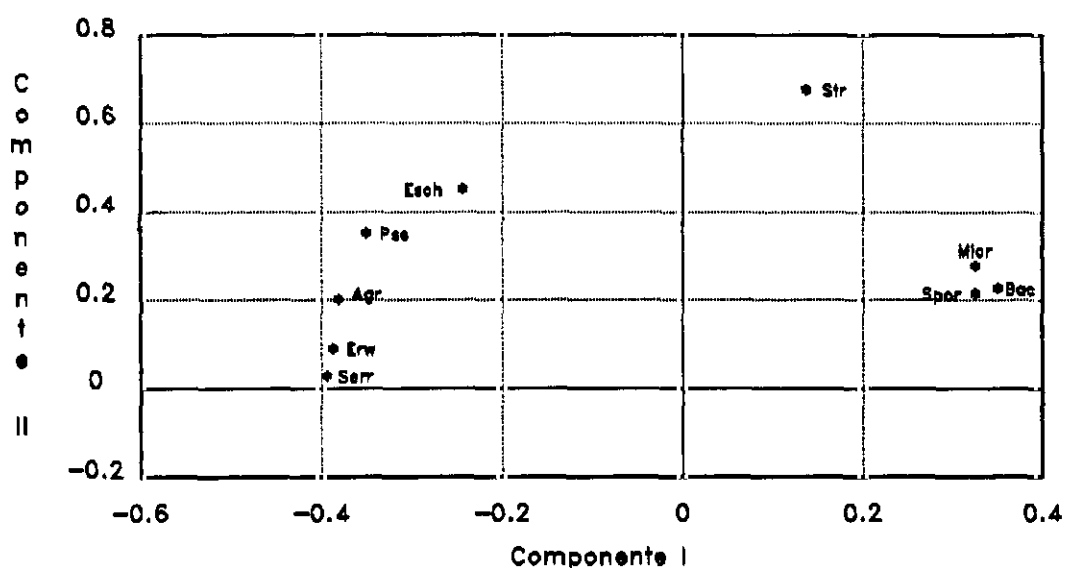


Figura 6.7. Ordenación de las variables según los factores de carga.



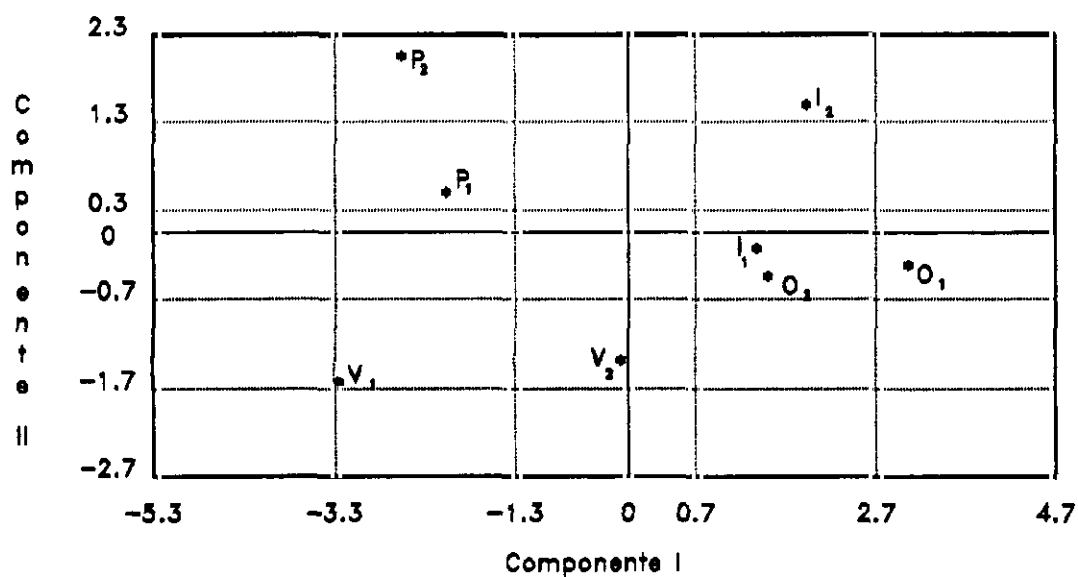


Figura 6.8. Ordenación de las muestras.

#### 6.2.4. Análisis de la varianza

El análisis de la varianza (Tabla 6.XI), muestra que hay diferencias significativas entre las estaciones ( $F=6.483$ ,  $p<0.01$ ), entre los géneros ( $F=91.592$ ,  $p<0.01$ ) y en la interacción de ambos ( $F=10.077$ ,  $p<0.01$ ).

Tabla 6.XI. Resultados del ANOVA.

Fuentes de VARIACION	G.l.	F	P	Significación
Estaciones	3	6.483	0.0013	S. (**)
Géneros	8	91.592	0.00	S. (**)
Interacción	24	10.077	$1 \times 10^{-6}$	S. (**)

Tabla 6.XII. Significación de los LSD de los géneros y de las estaciones.

	Bac.	Str.	Pse.	Erw.	Agr.	Esch.	Mic.	Spo.
Serr.	• •	• •	• •	NS	NS	NS	•	NS
Spo.	• •	•	• •	NS	NS	NS	NS	
Mic.	• •	•	• •	NS	NS	•		
Esch.	• •	• •	• •	NS	NS			
Agr.	• •	• •	• •	NS				
Erw.	• •	• •	• •					
Pse.	• •	• •						
Str.	• •							

	O	I	P
V	NS	• •	• •
P	•	NS	
I	•		

•  $p < 0.05$   
 \*\*  $p < 0.01$   
 NS no significativo

El LSD de estaciones y géneros (Tabla 6.XII), nos indica que existen diferencias significativas entre los géneros más abundantes (*Bacillus*, *Streptomyces* y *Pseudomonas*) con respecto al resto de los géneros bacterianos encontrados. Los menos abundantes (*Erwinia*, *Agrobacterium*, *Escherichia*, *Micrococcus*, *Serratia* y *Sporosarcina*) no muestran diferencias significativas entre sí, a excepción de *Micrococcus*, que presenta diferencias, aunque únicamente a nivel  $p < 0.05$ , con *Serratia* y *Escherichia*. En cuanto al LSD de las estaciones, el verano presenta diferencias significativas con primavera e invierno, al igual que el otoño, pero en este caso solo a nivel de  $p < 0.05$ .

La significación de los LSD de la interacción (Tablas 6.XIII y 6.XIV) se exponen disgregados, por estaciones y géneros, para una mejor comprensión de los mismos. La Tabla 6.XIII refleja la significación del LSD de la interacción de los géneros en cada estación. En otoño el único género que presenta diferencias significativas con el resto es *Bacillus*. En invierno, aparecen diferencias ( $p < 0.01$ ) entre *Bacillus* y los demás géneros estudiados y entre *Pseudomonas* y *Serratia*, *Sporosarcina*, *Escherichia* y *Agrobacterium*, pero únicamente a nivel  $p < 0.05$ . En primavera el LSD de la interacción muestra diferencias significativas a nivel  $p < 0.05$  entre *Bacillus* y el resto de los géneros a excepción de *Pseudomonas* y *Streptomyces*, y entre

Pseudomonas y el resto a excepción de Agrobacterium. Por último en verano, Pseudomonas presenta diferencias significativas ( $p<0.05$ ) con los demás géneros bacterianos.

Tabla 6.XIII. Significación del LSD de la interacción de los géneros en cada estación.

	Bac.	Str.	Psa.	Erw.	Agp.	Eesh.	Mis.	Spo.	
Serr.	•	NS	•	NS	NS	NS	NS	NS	
Spo.	•	NS	• •	NS	NS	NS	NS		
Mis.	•	NS	•	NS	NS	NS			
Eesh.	•	NS	•	NS	NS				
Agp.	•	NS	•	NS					
Erw.	•	NS	•						
Psa.	NS	•							
Str.	NS								
PRIMAVERA									
* $p<0.05$									
** $p<0.01$									
NS no significativo									
	Bac.	Str.	Psa.	Erw.	Agp.	Eesh.	Mis.	Spo.	
Serr.	NS	NS	•	NS	NS	NS	NS	NS	
Spo.	NS	NS	•	NS	NS	NS	NS		
Mis.	NS	NS	•	NS	NS	NS			
Eesh.	NS	NS	•	NS	NS				
Agp.	NS	NS	•	NS					
Erw.	NS	NS	•						
Psa.	NS	•							
Str.	NS								
VERANO									
	Bac.	Str.	Psa.	Erw.	Agp.	Eesh.	Mis.	Spo.	
Serr.	• •	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
Spo.	• •	NS	NS	NS	NS	NS	NS		
Mis.	• •	NS	NS	NS	NS	NS			
Eesh.	• •	NS	NS	NS	NS				
Agp.	• •	NS	NS	NS					
Erw.	• •	NS	NS						
Psa.	• •	NS							
Str.	• •								
OTOÑO									
	Bac.	Str.	Psa.	Erw.	Agp.	Eesh.	Mis.	Spo.	
Serr.	• •	NS	•	NS	NS	NS	NS	NS	
Spo.	• •	NS	•	NS	NS	NS	NS		
Mis.	• •	NS	NS	NS	NS	NS			
Eesh.	• •	NS	•	NS	NS				
Agp.	• •	NS	•	NS					
Erw.	• •	NS	NS						
Psa.	•	NS							
Str.	• •								
INVIERNO									

La Tabla 6.XIV muestra la significación del LSD de la interacción de las estaciones para cada género. Los únicos géneros con diferencias significativas en las distintas estaciones con respecto a los demás géneros son Bacillus y Pseudomonas. Bacillus presenta diferencias significativas en verano y primavera con respecto a otoño e invierno. En Pseudomonas, únicamente aparecen diferencias, a nivel de  $p<0.05$ , entre otoño y verano y otoño y primavera.

Tabla 6.XIV. Significación del LSD de la interacción de las estaciones para cada género.

	O	I	P	
V	* *	* *	NS	
P	*	*		
I	NS	BACILLUS		

	O	I	P	
V	*	NS	NS	
P	*	NS		
I	NS	PSEUDOMONAS		

	O	I	P	
V	NS	NS	NS	
P	NS	NS		
I	NS	AGROBACTERIUM		

	O	I	P	
V	NS	NS	NS	
P	NS	NS		
I	NS	STREPTOMYCES		

	O	I	P	
V	NS	NS	NS	
P	NS	NS		
I	NS	SPOROSARCINA		

	O	I	P	
V	NS	NS	NS	
P	NS	NS		
I	NS	ESCHERICHIA		

	O	I	P	
V	NS	NS	NS	
P	NS	NS		
I	NS	ERWINIA		

	O	I	P	
V	NS	NS	NS	
P	NS	NS		
I	NS	SERRATIA		

	O	I	P	
V	NS	NS	NS	
P	NS	NS		
I	NS	MICROCOCCLUS		

\*  $p < 0.05$   
 \*\*  $p < 0.01$   
 NS no significativo

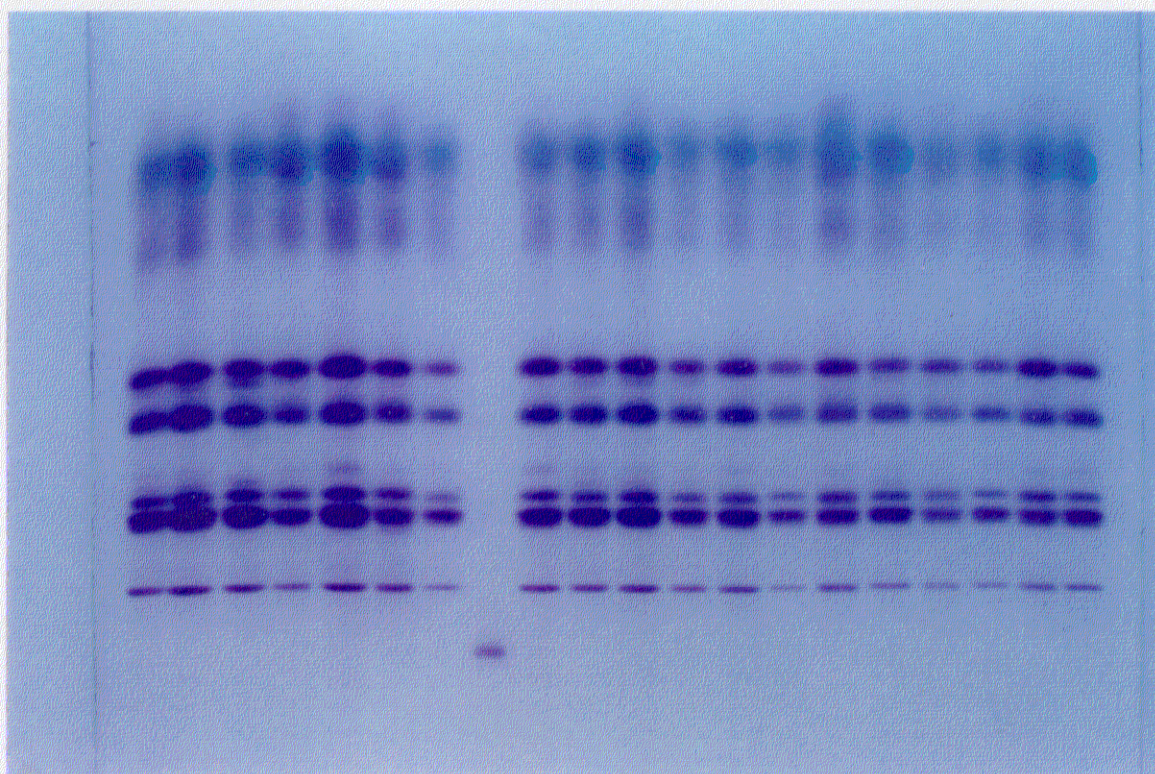


### 6.3. Efecto de las rizobacterias mayoritarias sobre la germinación de Alnus glutinosa

#### 6.3.1. Electroforesis de proteínas de reserva en las semillas empleadas

En las figuras 6.9, 6.10 y 6.11 se muestran las electroforesis efectuadas con las proteínas de reserva del aliso. Cada electroforesis se efectuó (véase apartado 3.2.3) sobre 60 semillas procedentes de distintos árboles de las tres zonas empleadas para la colección de estas.

Las electroforesis muestran una escasa variabilidad, que se limita a péptidos de pequeño tamaño. En cada caso se pueden apreciar 5 bandas nítidas de proteínas de reserva. Además se aprecian otras de menor tamaño que corresponden a proteínas de caracter enzimático.



**Figura 6.9.** Fotografía de la electroforesis en SDS-PAGE de las semillas de Humanes (Guadalajara)



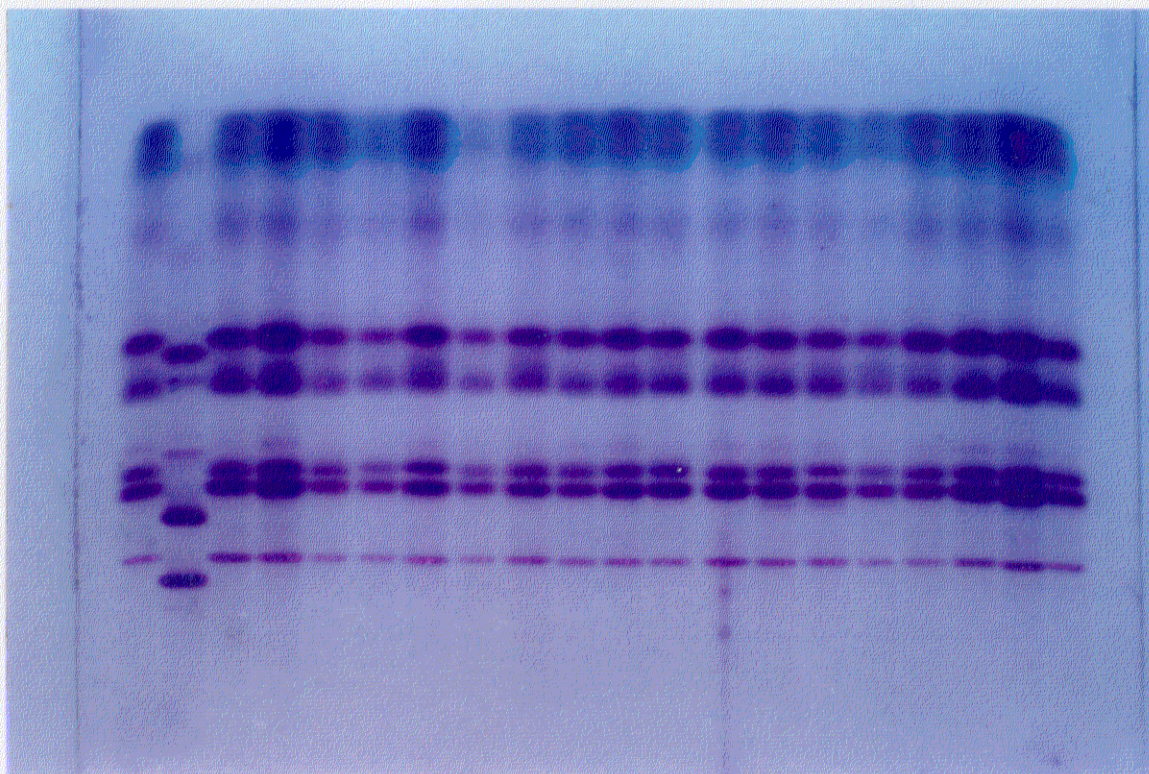


Figura 6.10. Fotografía de la electroforesis en SDS-PAGE de la semillas del arroyo "Las Tórtolas", San Martín de Valdiglesias (Madrid).

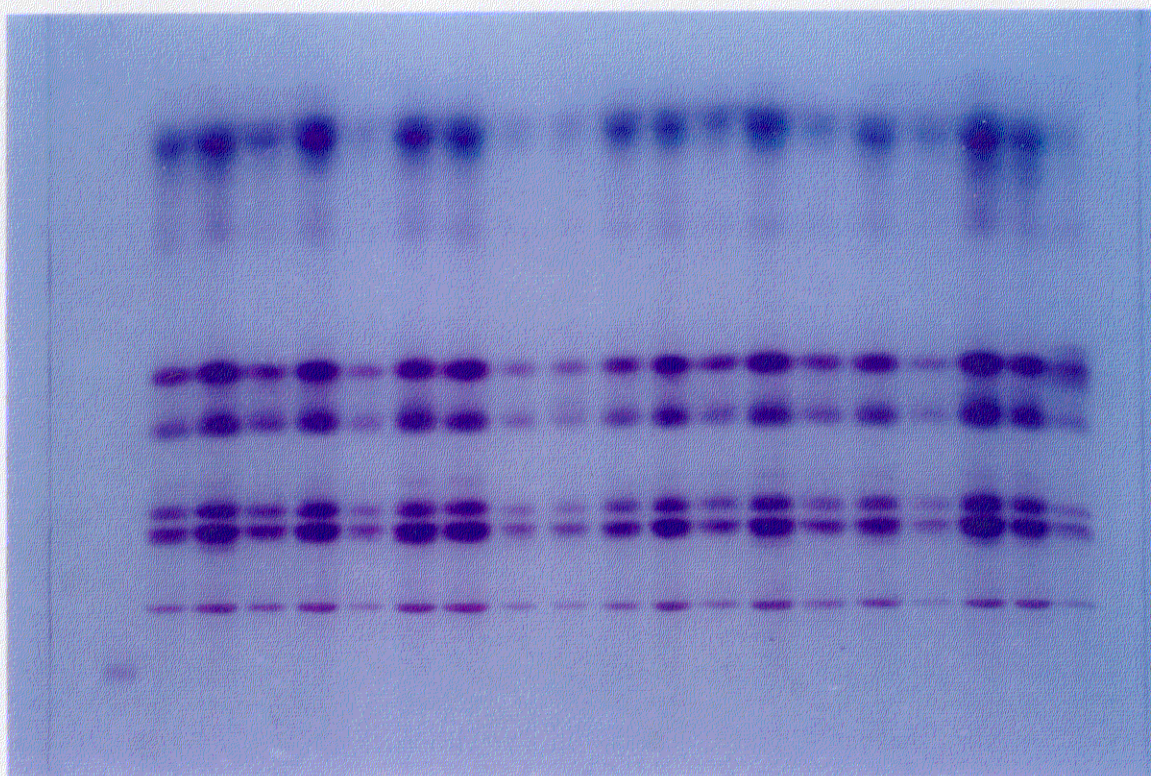


Figura 6.11. Fotografía de la electroforesis en SDS-PAGE de la semillas del río Ugalde, Murguía (Alava).



### 6.3.2. Resultados del ensayo de germinación

En la tabla 6.XV se muestran las medias de las réplicas de germinación de semillas (germinación diaria) en presencia del medio de cultivo bacteriano, preparado según se describe en 3.2.2. Se ensayaron las 27 cepas seleccionadas entre las mayoritarias (véase apartado 3.2.1), a dos concentraciones (10% y 20% del medio de cultivo bacteriano en el medio de soporte de las semillas). En la figura 6.12 se representan los valores medios de germinación acumulativa en cada grupo de bacterias y concentración. En el apéndice C (C.I.) se muestran los valores de las réplicas para cada ensayo.

**Tabla 6.XV.** Resultados de la germinación diaria (días 1º a 7º) de semillas en presencia de los medios de crecimiento bacteriano. Los datos son la media de las tres réplicas. (\*=medio al 20%; sin \*, al 10%; NC: nombre de la cepa, según el código definido en la tabla 6.III; TB: tipo de bacteria - género y grupo- B: Bacillus, P: Pseudomonas; NO: Número de identificación para el ACP, ANOVAs y LSDs)

NC	O.B.33	O.B.33*	O.B.41	O.B.41*	I.B.47	I.B.47*
TB	B, VII	B, VII	B, VI	B, VI	B, VII	B, VII
NO	1	2	3	4	5	6
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.33	0.33	0.00	5.00	0.33	0.66
3	4.00	5.66	5.66	4.33	3.66	6.00
4	2.66	3.66	4.00	0.66	1.66	3.00
5	1.00	0.33	0.33	0.00	1.33	0.00
6	0.33	0.00	0.00	0.00	0.33	0.00
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

NC	I.B.31	I.B.31*	V.P.26	V.P.26*	P.P.27	P.P.23*
TB	B, VI	B, VI	P, A	P, A	P, A	P, A
NO	7	8	9	10	11	12
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.00	4.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	5.00	5.00	0.00	0.00	0.00	0.00
4	3.66	0.33	0.66	0.00	1.33	0.00
5	0.33	0.00	1.33	0.33	1.33	0.00
6	0.00	0.00	2.33	0.33	1.33	1.00
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

Tabla 6.XV. (continuación).

NC TB NO	P.B.2 B, VII 13	P.B.2* B, VII 14	P.B.10 B, VI 15	P.B.10* B, VI 16	CNTR 10% - 17	CNTR 20% - 18
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.00	1.00	0.33	6.33	0.66	0.66
3	1.66	4.00	5.66	3.33	2.00	2.33
4	4.00	5.00	3.33	0.33	2.33	2.33
5	1.33	0.33	0.33	0.00	2.00	1.33
6	0.33	0.00	0.00	0.00	0.66	0.66
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.33	0.33

NC TB NO	O.B.22 B, VII 19	O.B.22* B, VII 20	O.B.45 B, VI 21	O.B.45* B, VI 22	I.B.44 B, VII 23	I.B.44* B, VII 24
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.66	0.33	0.00	5.66	0.33	1.00
3	5.00	5.00	6.33	3.66	4.66	5.33
4	2.66	3.00	2.66	0.33	3.33	2.33
5	1.00	0.66	0.66	0.00	0.66	0.33
6	0.00	0.66	0.00	0.33	0.00	0.33
7	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

NC TB NO	I.B.14 B, VI 25	I.B.14 B, VI 26	P.V.12 P, A 27	P.V.12* P, A 28	P.P.5 P, A 29	P.P.5* P, A 30
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.33	4.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	4.00	4.00	0.33	0.33	0.00	0.33
4	5.33	0.66	1.33	0.00	1.33	1.00
5	0.00	0.00	0.00	0.00	2.00	0.33
6	0.00	0.00	1.00	0.33	1.00	0.33
7	0.00	0.00	0.66	0.33	0.33	0.66



Tabla 6.XV. (continuación).

NC TB NO	P.B.8 P, A 31	P.B.8* P, A 32	I.B.1 P, A 33	I.B.1* P, A 34	O.B.34 B, VI 35	O.B.34* B, VI 36
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.00	6.66	0.66	0.33	0.00	4.66
3	6.33	3.00	2.00	5.00	5.00	4.66
4	2.33	0.33	2.66	4.00	4.00	0.66
5	0.66	0.00	1.33	0.00	0.33	0.00
6	0.00	0.00	0.66	0.00	0.33	0.33
7	0.00	0.00	0.00	0.33	0.33	0.33

NC TB NO	O.B.24 B, VII 37	O.B.24* B, VII 38	P.B.13 B, VII 39	P.B.13* B, VII 40	O.B.11 B, VI 41	O.B.11* B, VI 42
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.66	0.33	0.33	1.00	0.33	5.00
3	3.66	5.66	3.66	5.66	6.66	3.66
4	3.33	2.66	4.33	2.00	2.33	0.66
5	1.66	0.66	1.00	0.66	0.33	0.33
6	0.00	0.33	0.33	0.00	0.00	0.00
7	0.00	0.00	0.00	0.33	0.00	0.00

NC T1 NO	O.B.25 B, VII 43	O.B.25* B, VII 44	P.P.2 P, A 45	P.P.2* P, A 46	P.P.23 P, A 47	P.P.23* P, A 48
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.66	0.33	0.00	0.00	0.00	0.33
3	4.00	4.66	0.00	0.00	0.00	0.33
4	3.33	3.33	0.66	0.66	0.33	0.33
5	1.00	0.33	0.66	1.33	0.66	0.66
6	0.33	0.66	0.33	0.33	1.66	1.33
7	0.00	0.00	0.33	0.66	0.00	0.33

Tabla 6.XV. (continuación).

NC T1 NO	V.P.21 P, A 49	V.P.21* P, A 50	I.B.33 B, VI 51	I.B.33* B, VI 52	I.B.48 B, VI 53	I.B.48* B, VI 54
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.00	0.33	0.00	5.00	0.00	4.66
3	0.00	0.00	4.66	4.33	5.33	4.00
4	1.00	0.33	4.33	0.66	3.33	0.33
5	1.00	1.66	0.33	0.00	0.66	0.33
6	0.00	1.66	0.33	0.00	0.00	0.33
7	0.66	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

NC BT NO	I.B.39 B, VII 55	I.B.39* B, VII 56
1	0.00	0.00
2	0.66	0.33
3	5.33	4.00
4	3.00	3.33
5	0.33	1.33
6	0.33	0.00
7	0.00	0.00



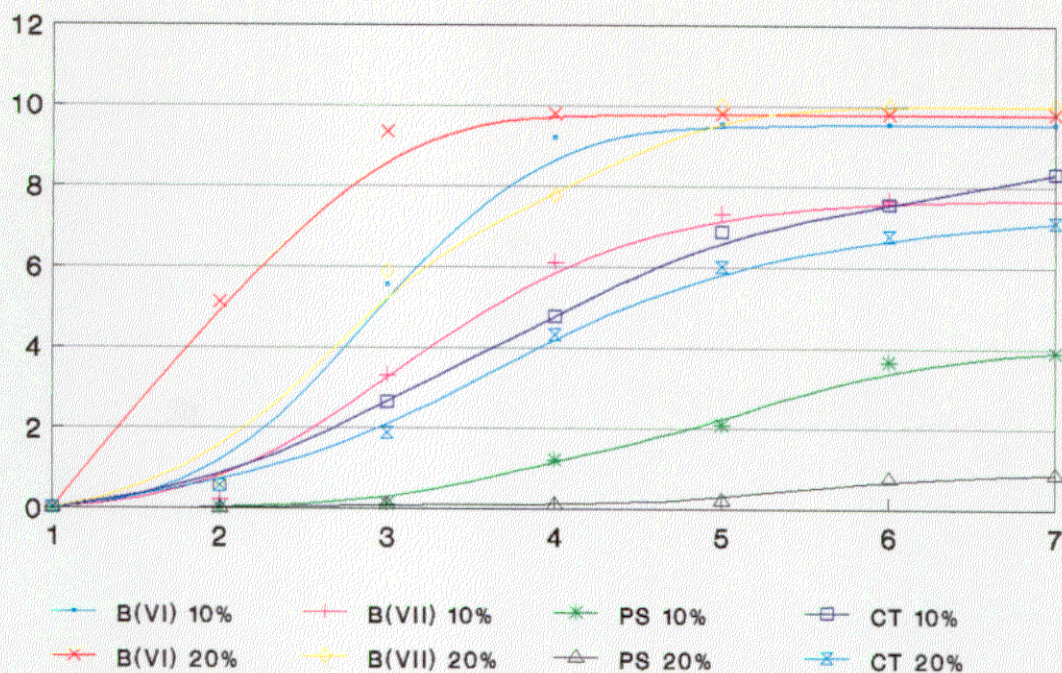


Figura 6.12. Representación de los valores medios de germinación acumulativa en cada grupo de bacterias y concentración, así como los controles.

Con los datos expuestos en la tabla 6.XV se efectuó un ACP. La matriz está formada por las cepas bacterianas ensayadas mas los controles y el número de semillas germinadas en cada uno de los 7 días que dura el ensayo, en presencia de los medios de crecimiento bacteriano al 10 y 20%. La matriz así definida (7 x 56) permite representar las muestras en un espacio definido por dos ejes principales que absorben un porcentaje de varianza del 55.86% y 24.36% respectivamente (Tabla 6.XVI) y por tanto la ordenación se refiere a estos dos ejes principales, que absorben entre ambos un 80.22% de la varianza.



Tabla 6.XVI. Absorción de varianza de los primeros ejes del ACP efectuado con la germinación de semillas.

Eje                      % de varianza    Varianza acumulada

1	55.86122	55.86122
2	24.36587	80.22709
3	9.435476	89.66256
4	6.030010	94.36626
5	3.101445	98.69257
6	1.205979	100.0000

Como se puede observar en la figura 6.13 existe una clara segregación de 3 grupos: el primero (A) formado por cepas cuyos efectos sobre la germinación son análogos o relativamente próximos a los controles, integrado por Bacillus del tipo VII (al 10 y 20%) y del tipo VI al 10%; el segundo grupo (B) reúne a todas las Pseudomonas ensayadas (al 10 y 20%) y el tercero (C) a los Bacillus del tipo VI al 20%.

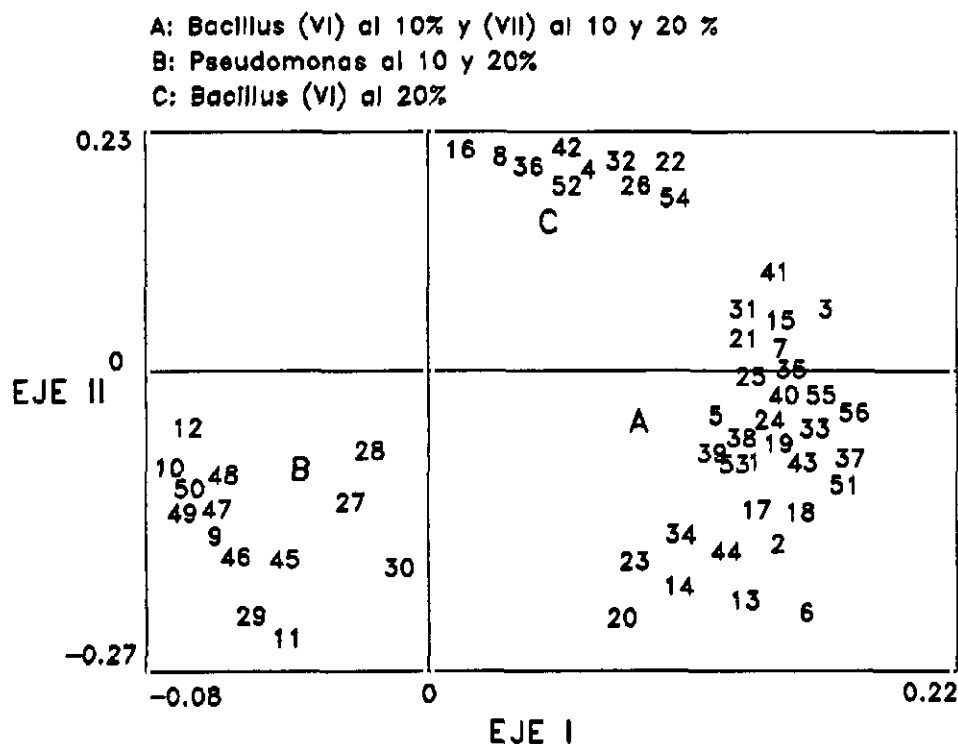


Figura 6.13. Representación del ACP de germinación de semillas.

### 6.3.3. ANOVAS de pendientes de las rectas de regresión obtenidas a partir de los datos de germinación

Con el fin de establecer la significación estadística de los grupos encontrados en el ACP se efectuó un ANOVA de pendientes (Sokal y Rholf, 1979) con las rectas resultantes de la germinación acumulativa de los tres grupos de bacterias a las dos concentraciones ensayadas. Los valores medios de germinación acumulada para cada grupo de cepas bacterianas y la ecuación de la recta de regresión obtenida para dichos valores se exponen en la tabla 6.XVII.

El ANOVA muestra la existencia de diferencias significativas ( $F=8.2631$ , g.l.= 7,42,  $p<0.01$ ). Se efectuó a continuación, un LSD que nos permitió confirmar la existencia de los tres grupos de cepas (detectadas en el ACP) que presentan un efecto estadísticamente significativo sobre la germinación: grupo A activadoras (Bacillus tipo VI al 20%), grupo B, indiferentes (Bacillus tipo VII, ambas concentraciones y Bacillus tipo VI al 10%) y grupo C, inhibidoras (Pseudomonas al 10 y 20%), (tabla 6.XVIII).

Tabla 6.XVII. Valores medios de germinación acumulativa en cada uno de los grupos bacterianos definidos. Bajo los datos se expone la ecuación de la recta de regresión obtenida con los valores medios de cada grupo.

10%				
Dia	<u>Bacillus VI</u>	<u>Bacillus VII</u>	<u>Pseudomonas</u>	Control
1	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.12	0.15	0.00	0.55
3	5.44	3.33	0.22	2.66
4	9.36	6.16	1.33	4.77
5	9.55	7.33	2.11	6.88
6	9.55	7.66	3.77	7.55
7	9.55	7.66	3.99	8.32
	$y=1.30+0.43x$	$y=1.27+0.58x$	$y=2.03+1.20x$	$y=1.24+0.62x$
20%				
Dia	<u>Bacillus VI</u>	<u>Bacillus VII</u>	<u>Pseudomonas</u>	Control
1	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.16	0.77	0.00	0.55
3	9.14	5.66	0.11	1.88
4	9.76	7.66	0.22	4.32
5	9.99	9.66	0.33	5.99
6	9.99	9.77	0.77	6.77
7	9.99	9.77	0.99	7.10
	$y=0.44+0.46x$	$y=1.05+0.47x$	$y=2.19+5.22x$	$y=1.30+0.70x$

Tabla 6.XVIII. Significaciones del LSD. (B,VI: Bacillus grupo VI; B,VII: Bacillus grupo VII; Ps: Pseudomonas; C: control; NS: no significativo; \*:  $p<0.05$ ; \*\*:  $p<0.01$ ).  
10 %                      20 %

		B,VI	B,VII	Ps	C	B,VI	B,VII	Ps
20 %	C	*	NS	**	NS	**	NS	**
	Ps	**	**	NS	**	**	**	
	B,VII	NS	NS	**	NS	**		
	B,VI	**	**	**	**			
10 %	C	NS	NS	**				
	Ps	**	**					
	B,VII	NS						

#### 6.3.4. ANOVAs de pendientes de los grupos de cepas activadoras e inhibidoras

Para establecer la significación estadística del efecto de las cepas activadoras (Bacillus tipo VI al 20%) o inhibidoras (Pseudomonas al 10 y 20%) sobre la germinación se efectuaron otros dos ANOVAs de pendientes. Se emplearon las rectas resultantes de la germinación acumulativa de las cepas de dichos grupos por separado y los respectivos controles. Estos ANOVAs nos permiten señalar que cepas son activadoras o inhibidoras en cada caso. La media de los valores empleados para la elaboración de dichos ANOVAs y las rectas resultantes se muestran en las tablas 6.XIX y 6.XX.

El ANOVA realizado con las cepas de Bacillus tipo VI al 20% detecta diferencias significativas ( $F=6.3492$ , g.l.= 8,45,  $p<0.01$ ). El LSD realizado sólo indica diferencias entre el control y el resto.

Tabla 6.XIX. Valores de germinación acumulativa empleados para el ANOVA de pendientes con las cepas de Bacillus grupo VI al 20% y sus correspondientes rectas de regresión. (NC: nombre de la cepa; NO: número de identificación para el ACP, ANOVAs y LSDs)

NC NO	O.B.41 4	O.B.31 8	P.B.10 16	O.B.45 22	I.B.14 26	P.B.8 32
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	5.00	4.00	6.33	4.00	4.00	0.66
3	9.33	9.00	9.66	8.00	8.00	9.66
4	9.99	9.33	9.99	8.66	8.66	9.99
5	9.99	9.33	9.99	8.66	8.66	9.99
6	9.99	9.33	9.99	8.99	8.66	9.99
7	9.99	9.33	9.99	8.99	8.66	9.99

NC NO	O.B.34 36	O.B.11 42	CNTR 18
1	0.00	0.00	0.00
2	4.66	5.00	0.66
3	9.33	8.66	2.99
4	9.33	9.33	5.33
5	9.33	9.99	6.66
6	9.66	9.99	7.33
7	9.99	9.99	7.66

Tabla 6.XIX. (continuación).

Cepa:NC	NO	Ecuación de la recta
O.B.41	4	$y=0.50+0.45x$
I.B.31	8	$y=0.64+0.45x$
P.B.10	16	$y=0.47+0.44x$
O.B.45	22	$y=0.41+0.46x$
I.B.14	26	$y=0.53+0.51x$
P.B.8	32	$y=0.47+0.43x$
O.B.34	36	$y=0.49+0.46x$
O.B.11	42	$y=0.35+0.48x$
CNTR.	18	$y=1.16+0.66x$

El ANOVA realizado con las cepas de Pseudomonas al 10 y 20% muestra que existen diferencias significativas ( $F=9.4747$ , g.l.= 15,82,  $p<0.01$ ). El LSD realizado muestra que no existen diferencias significativas solamente entre las cepas 10 frente a 29, las 27, 46, 47 y 48 entre si y los controles entre si (tabla 6.XXI).

**Tabla 6.XX.** Valores de germinación acumulativa empleados para la elaboración del ANOVA de pendientes con las cepas de Pseudomonas al 10 y 20% y las rectas resultantes. (\*:Medios al 20%, sin \*, al 10%; NC: nombre de la cepa; NO: Número de identificación para el ACP, ANOVAs y LSDs)

NC NO	V.P.26 9	V.P.26* 10	P.P.27 11	P.P.27* 12	V.P.12 27	V.P.12* 28
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3	0.00	0.00	0.00	0.00	0.33	0.33
4	0.66	0.00	1.33	0.00	1.66	0.33
5	1.99	0.33	2.66	0.00	1.66	0.33
6	4.33	0.66	3.99	1.00	2.66	0.66
7	4.33	0.66	3.99	1.00	3.33	0.99

NC NO	P.P.5 29	P.P.5* 30	P.P.2 45	P.P.2* 46	P.P.23 47	P.P.23* 48
1	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.00	0.00	0.00	0.00	0.33	0.00
3	0.00	0.33	0.00	0.00	0.66	0.00
4	1.33	1.33	0.66	0.66	0.99	0.33
5	3.33	1.66	1.33	1.99	1.66	0.99
6	4.33	1.99	1.66	2.33	2.99	2.66
7	4.66	2.66	1.99	2.99	3.33	2.66

NC NO	V.P.21 49	V.P.21* 50	CNTR 17	CNTR* 18
1	0.00	0.00	0.00	0.00
2	0.00	0.33	0.66	0.66
3	0.00	0.33	2.66	2.99
4	1.00	0.66	4.99	5.33
5	2.00	2.33	6.99	6.66
6	2.00	3.99	7.66	7.33
7	2.66	3.99	7.99	7.66



Tabla 6.XX. (continuación).

Cepa:NC	NO	Ecuación de la recta
V.P.26	9	$y=2.38+1.00x$
V.P.26*	10	$y=2.55+6.14x$
P.P.27	11	$y=2.08+1.11x$
P.P.27*	12	$y=3.00+3.50x$
V.P.12	27	$y=1.81+1.58x$
V.P.12*	28	$y=1.83+5.74x$
P.P.5	29	$y=2.10+0.97x$
P.P.5*	30	$y=1.70+2.01x$
P.P.2	45	$y=2.04+2.42x$
P.P.2*	46	$y=2.16+4.61x$
P.P.23	47	$y=1.71+1.60x$
P.P.23*	48	$y=2.48+1.59x$
V.P.21	49	$y=2.01+1.81x$
V.P.21*	50	$y=2.09+1.14x$
CTR	17	$y=1.20+0.63x$
CTR*	18	$y=1.10+0.66x$

Tabla 6.XXI. Significaciones del LSD efectuado con las rectas de regresión resultantes de los ensayos con las cepas del género Pseudomonas. Los números corresponden al ordinal asignado en las tablas precedentes (NO) a cada cepa (C: control; NS: no significativo; \*:  $p<0.05$ ;  $p<0.01$ ).

	9	10	11	22	27	28	29	30	45	46	47	48	49	50	C20%
C10%															NS
C20%															
50															
49					*			*							
48					NS					NS	NS				
47					NS					NS					
46					NS										
45															
30															
29		NS													
28															
27															
22															
11															
10															

□ = \*\*

#### 6.4. Efecto de las rizobacterias mayoritarias sobre el crecimiento de Alnus glutinosa

Los resultados completos obtenidos en estas experiencias se muestran en el apéndice C, tablas C.II., C.III.1 y C.III.2. En la tabla 6.XXII. se muestran los datos empleados para las elaboración de los ACP que posteriormente se exponen. Cada valor es el resultado de la media de tres réplicas.

Tabla 6.XXII. Datos empleados para las elaboración del ACP total (plantas noduladas y sin nodular). Los números de orden pares corresponden al ensayo con medio de crecimiento bacteriano al 20% y los impares al 10%. NO: número de orden para ACPs y ANOVAs o LSDs.

##### Plantas noduladas (PN)

Cepa	NO	Sup. Aerea	Long. Aerea	Nº.Hs.	long. rad.	Sup. rad.	NT
O.B.41	1	5.2523	4.8916	7.3	4.8037	0.9781	2.049
	2	5.3155	4.3092	7.3	4.9056	0.9578	2.040
O.B.45	3	4.9909	4.8109	7.3	4.8639	0.9631	2.063
	4	5.2286	4.7724	7.0	4.8513	0.9993	2.051
O.B.34	5	9.3524	7.8527	8.6	7.8971	2.9691	3.093
	6	9.2505	7.8034	8.6	7.9013	2.8913	3.053
O.B.11	7	5.2712	4.9105	7.3	4.8314	0.9513	2.033
	8	5.2069	4.8627	7.3	4.9234	0.9613	2.084
O.B.33	9	7.2393	6.7578	9.0	6.3913	1.2110	2.043
	10	7.1172	6.7780	8.6	6.2584	0.9126	2.033
O.B.22	11	6.8322	6.0314	8.6	4.5162	0.9327	2.049
	12	7.1434	6.7361	8.6	4.7391	0.9043	2.033
O.B.24	13	6.9713	6.3862	8.3	4.6887	0.7381	2.075
	14	7.4313	7.2699	9.0	4.9326	1.0416	2.023
O.B.25	15	7.3615	6.8344	9.0	4.9109	1.1495	2.029
	16	7.5564	7.0775	9.3	4.9595	1.0637	2.043
V.P.26	17	5.2134	4.9008	7.3	4.2123	0.8366	0.677
	18	5.2121	4.3400	7.3	4.2458	0.8369	0.667
V.P.12	19	5.1125	4.5968	7.3	4.2130	0.8327	0.690
	20	5.3002	4.8021	7.6	4.2281	0.8042	0.676
V.P.21	21	5.1900	4.9630	7.6	4.2271	0.8572	0.625
	22	5.2564	4.9386	7.6	4.5296	0.8446	0.629
P.B.10	23	9.4758	7.8025	9.3	7.8510	4.0490	4.732
	24	9.8596	7.7582	9.3	8.1647	4.0570	3.187
P.B.8	25	5.1564	4.7756	7.3	4.8199	2.0642	2.159
	26	5.3222	4.8826	7.6	4.6438	2.0457	2.082

**Tabla 6.XXII. (continuación)**

**Plantas noduladas (PN)**

<u>Cepa</u>	<u>NO</u>	<u>Sup. Aerea</u>	<u>Long. Aerea</u>	<u>Nº.Hs.</u>	<u>long. rad.</u>	<u>Sup. rad.</u>	<u>NT</u>
P.B.2	27	7.0408	6.6382	8.6	5.9299	1.0716	2.146
	28	7.3228	6.7759	9.3	6.1580	1.2306	2.096
I.B.39	29	7.4015	7.0435	9.3	6.1930	1.1764	2.120
	30	7.1928	6.6752	8.6	6.0090	1.0232	2.091
P.B.13	31	6.9627	7.0974	9.0	4.8711	0.9979	2.073
	32	6.6862	7.0378	8.3	4.7254	0.8767	2.112
P.P.27	33	5.2935	4.9696	7.6	4.2636	0.8877	0.628
	34	5.4518	4.9107	8.0	4.3633	0.9067	0.613
P.P.5	35	5.4848	4.8466	7.3	4.1583	0.8578	0.429
	36	5.4256	4.8347	7.3	4.1708	0.8142	0.629
P.P.2	37	5.5515	4.8497	7.6	4.3573	0.8637	0.624
	38	5.5698	5.0082	7.6	4.2526	0.8852	0.631
P.P.23	39	5.4354	4.8944	7.3	4.1282	0.7204	0.635
	40	5.5352	4.8955	7.6	4.5510	0.8466	0.648
I.B.31	41	8.9090	7.2264	9.0	7.8946	3.2559	3.429
	42	9.3762	7.5584	9.3	7.9054	2.3075	3.428
I.B.14	43	5.2705	4.8740	7.3	4.8164	0.8416	2.123
	44	5.4773	4.8901	7.6	4.8734	1.0268	2.084
I.B.48	45	5.6561	4.8757	7.6	4.8825	1.0842	2.052
	46	5.7129	4.7126	7.3	4.8436	0.7969	2.110
I.B.33	47	5.5339	4.7612	7.3	4.8193	0.8764	2.054
	48	5.4278	4.7848	7.3	4.7793	1.0551	2.111
I.B.47	49	7.2060	6.7073	8.6	6.0265	1.2460	2.132
	50	7.3908	6.9573	9.3	6.1267	1.2997	2.084
I.B.44	51	7.2449	6.9168	9.0	6.0899	1.0872	2.107
	52	7.1457	6.7474	8.6	5.9578	0.9800	2.054
I.B.1	53	7.3115	6.9265	9.0	6.0993	1.0456	2.091
	54	7.2898	6.8421	9.0	6.0918	1.0972	2.078
CNTRL	55	5.5427	5.3333	7.0	4.0772	1.1760	2.458
	56	5.8198	5.4874	7.3	4.3704	1.2244	2.125

**Plantas sin nodular (PSN)**

O.B.41	59	5.2520	4.9169	7.3	4.2138	0.9557	1.057
	60	5.4339	5.0071	7.3	4.3256	1.0100	1.061
O.B.45	61	5.2346	4.6902	7.0	4.2044	0.9345	1.050
	62	5.3028	4.4158	7.3	4.3158	0.9422	1.049
O.B.34	63	9.2567	8.0275	9.3	6.2140	3.2804	1.728
	64	9.3959	8.2439	9.3	6.2127	2.9563	1.715
O.B.11	65	5.2771	4.7508	7.0	4.2432	0.9741	1.044
	66	5.4115	4.9397	7.3	4.2595	0.9397	1.057
O.B.33	67	6.9186	6.0104	8.3	4.5158	0.9579	1.083
	68	6.9834	5.9709	8.6	4.3649	0.9897	1.086
O.B.22	69	6.9839	6.0266	8.6	4.3053	0.9772	1.046
	70	6.9711	9.9724	8.3	4.4093	0.9316	1.054
O.B.22	71	6.9375	5.9901	8.3	4.3216	0.9962	1.051
	72	6.8899	6.1804	8.6	4.3804	1.3240	1.402

**Tabla 6.XXII. (continuación)**

**Plantas sin nodular (PSN)**

<u>Cepa</u>	<u>NO</u>	<u>Sup. Aérea</u>	<u>Long. Aérea</u>	<u>Nº.Hs.</u>	<u>long. rad.</u>	<u>Sup. rad.</u>	<u>NT</u>
O.B.25	73	6.9293	6.7289	8.3	4.2833	0.9498	1.065
	74	7.0516	6.7979	8.3	4.3155	0.9260	1.029
V.P.26	75	3.6638	3.9202	4.3	1.3817	2.3100	0.483
	76	4.2357	3.8123	5.3	1.5829	2.5493	0.541
V.P.12	77	3.7517	3.8811	4.6	1.3999	2.3187	0.427
	78	4.2382	3.9572	5.6	1.5719	2.5486	0.528
V.P.21	79	3.7583	3.7589	4.6	1.3748	2.2436	0.462
	80	4.4227	4.0848	5.6	1.6495	2.7795	0.512
P.B.10	81	8.8672	8.2672	7.3	6.5745	2.7589	1.733
	82	8.9194	7.5159	9.3	6.8955	2.8080	1.728
P.B.8	83	5.1458	4.2855	7.0	4.5861	0.8951	1.055
	84	5.3186	4.5314	7.3	4.3061	0.9762	1.045
P.B.2	85	6.9483	6.0592	8.6	4.2864	0.9151	1.046
	86	7.0193	6.1301	8.6	4.2968	0.9669	1.042
I.B.39	87	6.8662	6.1032	8.3	4.2482	0.9436	1.074
	88	6.9654	6.1813	8.6	4.3364	0.9356	1.092
P.B.13	89	6.8849	6.0115	8.6	4.2712	0.9867	1.061
	90	6.8926	6.0546	8.6	4.3203	1.0728	1.033
P.P.27	91	3.7892	3.9856	4.6	1.3538	2.4196	0.428
	92	4.1506	3.9632	5.3	1.5036	2.6001	0.426
P.P.5	93	3.5527	3.8748	4.3	1.3414	2.3499	0.418
	94	4.3755	3.9555	5.6	1.6705	2.7775	0.466
P.P.2	95	3.6073	4.0052	4.3	1.3762	2.2991	0.434
	96	4.2464	4.1802	5.3	1.5976	2.6052	0.508
P.P.23	97	3.8789	4.0502	4.6	1.3714	2.2743	0.312
	98	4.2603	4.1230	5.6	1.6797	2.8163	0.522
I.B.31	99	8.9427	7.9134	9.3	7.6057	3.3074	1.040
	100	9.0827	7.9449	9.6	7.6854	3.3069	1.043
I.B.14	101	5.2531	4.8863	7.3	4.3139	0.9497	1.056
	102	5.3023	4.8833	7.3	4.3219	0.9363	1.063
I.B.48	103	5.2761	4.9246	7.6	4.2724	0.9741	1.053
	104	5.4134	4.9448	7.6	4.3521	0.9736	1.056
I.B.33	105	5.4415	4.9435	7.6	4.3286	0.9561	1.054
	106	5.4157	4.9457	7.6	4.3890	0.9626	1.057
I.B.47	107	6.8796	5.9272	8.3	4.3159	0.9303	1.070
	108	6.8786	5.9172	8.3	4.3011	0.9820	1.082
I.B.44	109	6.9861	6.1164	8.6	4.2818	0.9551	1.084
	110	6.9359	5.9806	8.3	4.3205	0.9074	1.077
I.B.1	111	6.9530	6.0411	8.6	4.2713	0.9509	1.097
	112	6.9229	6.1309	8.6	4.3319	0.9447	1.087
CNTRL	113	5.3925	5.2688	6.3	3.1584	1.1756	1.045
	114	5.4380	5.3077	6.6	3.2960	1.1955	1.050

Unidades: Superficie parte aérea (Sup. Aérea) y radical (Sup. rad.) en cm<sup>2</sup>; longitud parte aérea (Long. Aérea) y radical (long. rad.) en cm; nitrógeno total (NT) en mg N/g seco de planta. NºHs. número de hojas.

**6.4.1. ACP realizado con los datos de crecimiento vegetal bajo el efecto de las diferentes cepas ensayadas.**

Con los resultados expuestos en la tabla 6.XXII, se efectuó un ACP con el fin de apreciar las tendencias de agrupamiento. El análisis se efectuó considerando plantas noduladas (PN) y sin nodular (PSN) y las dos concentraciones del medio de crecimiento de cada cepa (10 ó 20%). Como resultado del ACP efectuado sobre la matriz de 112 x 6 se obtiene la ordenación que se representa en la figura 6.14. Los dos primeros ejes absorben un porcentaje de varianza del 68.08% y del 18.28% respectivamente (tabla 6.XXIII), por lo que la ordenación de las muestras se refiere a estos dos ejes principales, que absorben, conjuntamente un 86.35% de la varianza total.

**Tabla 6.XXIII. Absorción de varianza de los primeros ejes del ACP realizado con los parámetros comunes de PN y PSN.**

Eje	% de varianza	Varianza acumulada
1	68.07067	68.07067
2	18.28246	86.35314
3	9.12505	95.47819
4	2.86063	98.33882
5	1.17729	99.51611
6	0.48389	100.0000

Como puede observarse en la figura 6.14, la ordenación de las muestras exhibe una clara segregación en tres grupos: el primero (A) localizado hacia los valores más negativos del eje I integrado por los tratamientos sobre PSN con Pseudomonas a las dos concentraciones ensayadas (estas cepas, véase tabla 6.XXII, reducen notablemente varios de los parámetros medidos); el segundo (B) ubicado hacia los valores positivos de ambos ejes integrado por los tratamientos sobre PN y PSN de tres cepas de Bacillus (tipo VI) que al observar los datos de la tabla 6.XXII se muestran como claramente activadores, tanto al 10 como al 20%; finalmente un tercer grupo (C) en el que aparecen el resto de las muestras y los controles. En este grupo se pueden establecer cuatro subgrupos bastante homogéneos internamente.

El primero (C1) se localiza hacia los valores negativos del eje I y está integrado básicamente por las cepas de Bacillus (VI) a ambas concentraciones sobre PSN.

El segundo subgrupo (C2) reúne también cepas de Bacillus (VI), en este caso sobre PN.

El tercero (C3), localizado sobre valores positivos del eje I está integrado en su totalidad por muestras de Bacillus (VII) a ambas concentraciones sobre PSN.

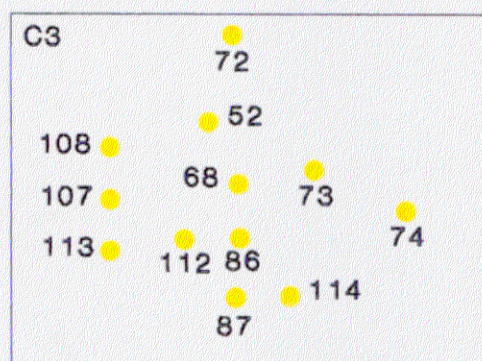
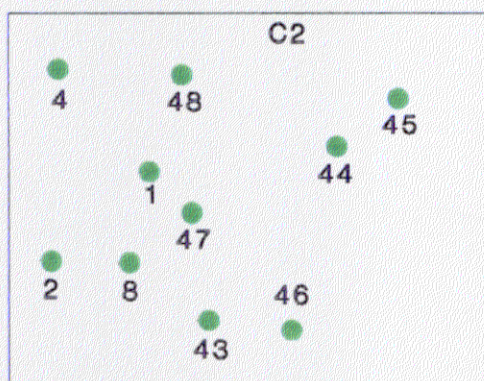
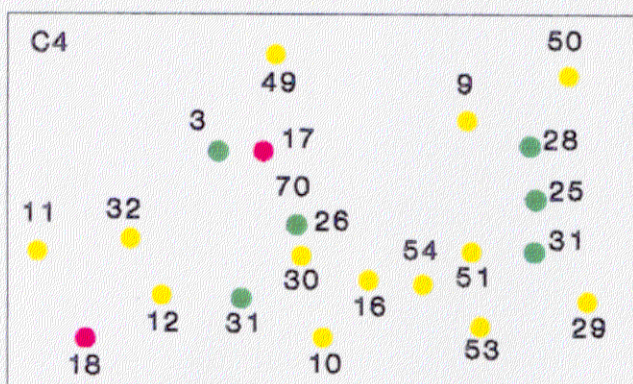
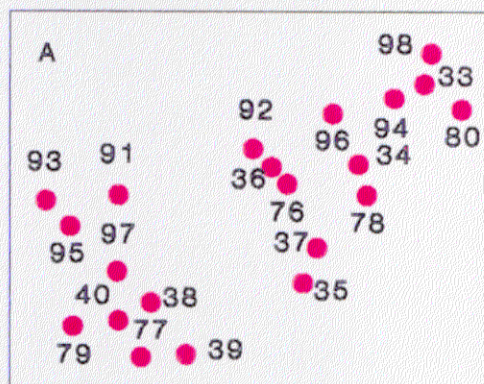
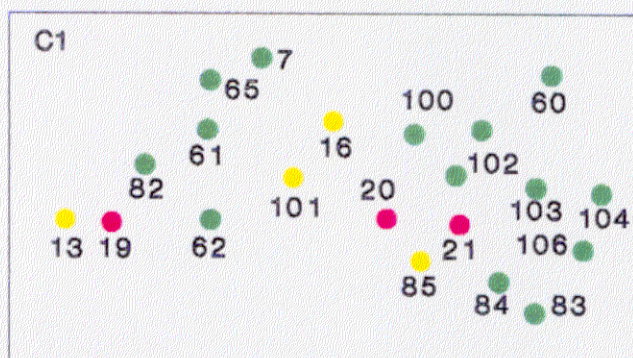
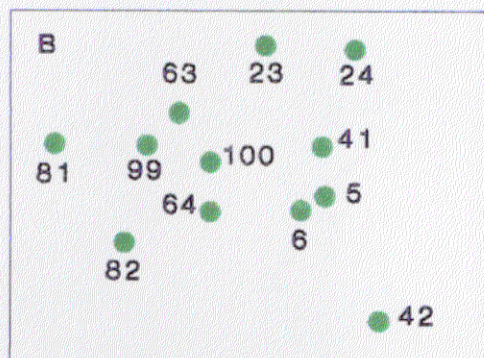
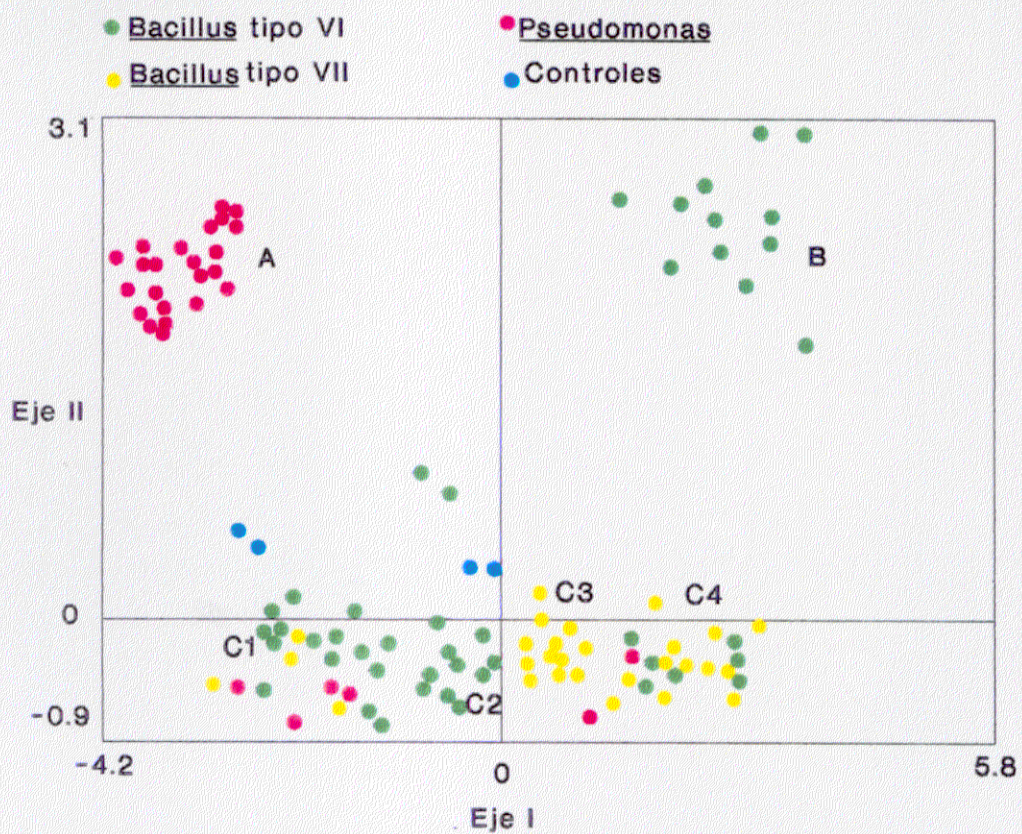
Por último, el cuarto subgrupo (C4), el más heterogéneo, está integrado por cepas de los tres grupos ensayados, si bien dominan las cepas de PN tratadas con Bacillus (VII) ensayadas sobre PN.

La ordenación de las variables según los factores de carga aparecen en la figura 6.15. Como se puede ver las variables que se encuentran más agrupadas entre sí (hacia los valores negativos del eje II) son las longitudes de la parte aérea y radical (LA y LR), el número de hojas (NH), el nitrógeno total (NT) y la superficie de la parte aérea (SA). La única variable que aparece separada del resto es el superficie radical (SR), localizada hacia los valores positivos del eje II.

**Figura 6.14.** Representación de las muestras del ACP efectuado con los resultados totales (PN y PSN) sobre los dos primeros ejes. Los números de orden y las cepas a las que corresponden se recogen en la tabla 6.XXII. Los grupos A, B y C son a los que se hace referencia en el texto.

(Página siguiente)







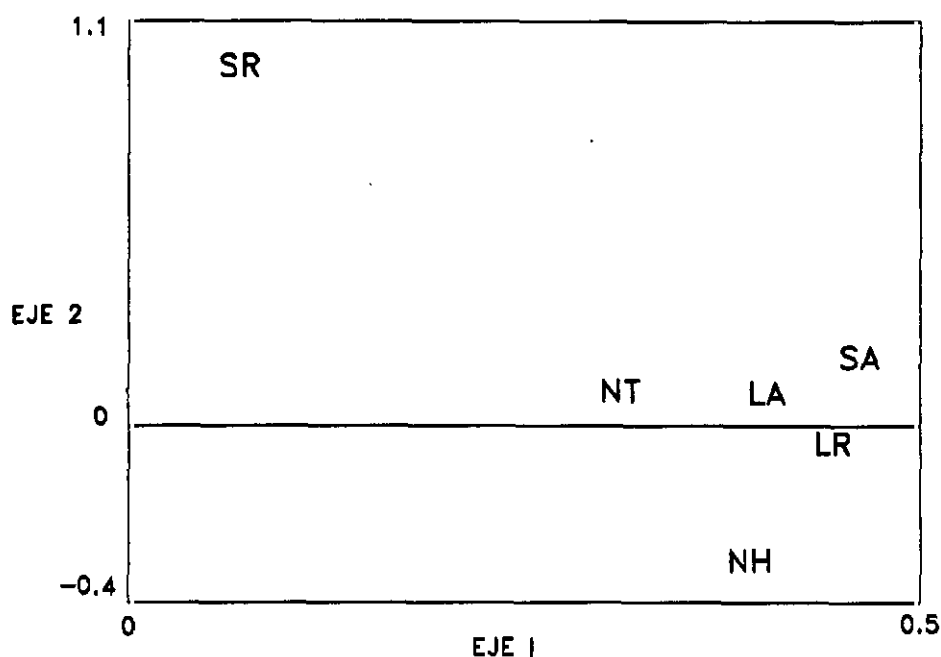


Figura 6.15. Ordenación de las variables según los factores de carga del ACP efectuado con los resultados totales (PN y PSN) sobre los dos primeros ejes (datos en la tabla 6.XXII). Las siglas empleadas son las que se recogen en el texto.

#### 6.4.2. ACP de los resultados en plantas sin nodular (PSN)

La ordenación de las muestras precedente, evidencia un claro efecto diferencial en los ensayos dependiendo del tipo de planta sujeto del ensayo (PN o PSN) debido a lo que se procedió a ordenar separadamente dichos grupos de resultados.

En este caso (ACP de PSN) se emplearon los datos recogidos en la tabla 6.XXII, desde el número de orden (NO) 59 hasta el 114, ambos inclusive, resultando así una matriz de 56 x 6. Se obtiene la ordenación de las cepas que se representa en la figura 6.16. Los dos primeros ejes absorben un porcentaje de varianza del 74.31% y del 17.63% respectivamente (tabla 6.XXIV), por lo que la ordenación de las muestras se refiere a estos dos ejes principales, que absorben, conjuntamente un 91.94% de la varianza total.

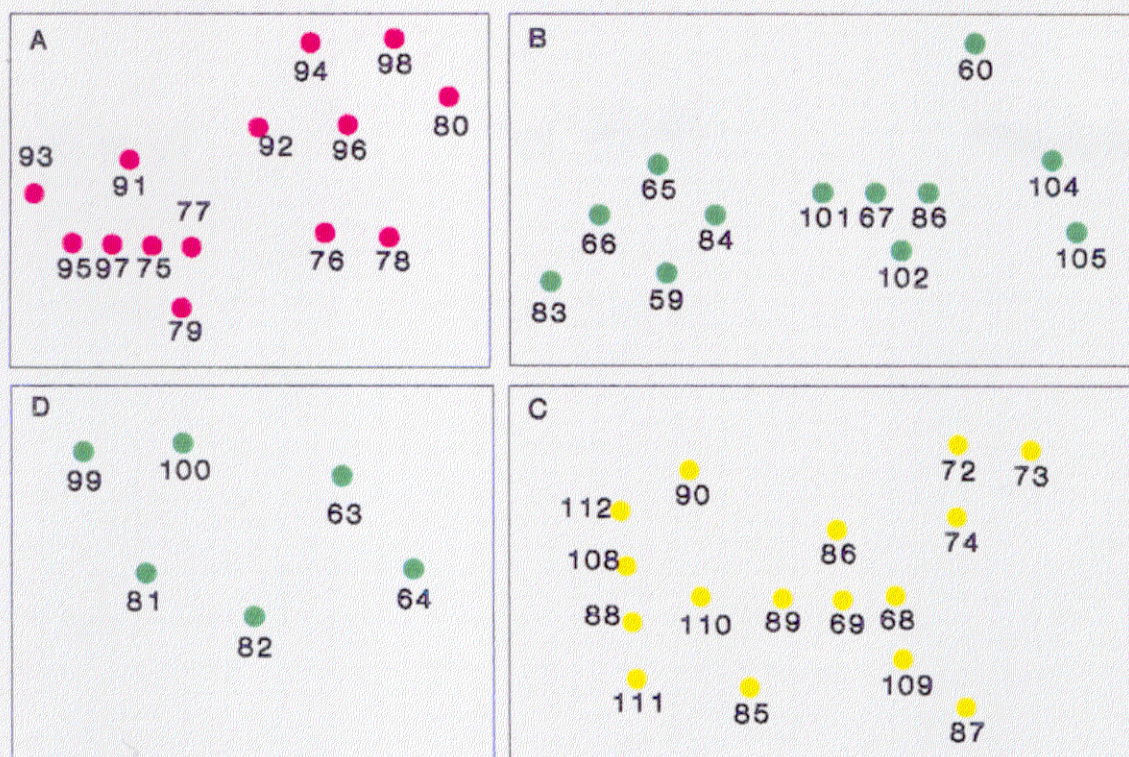
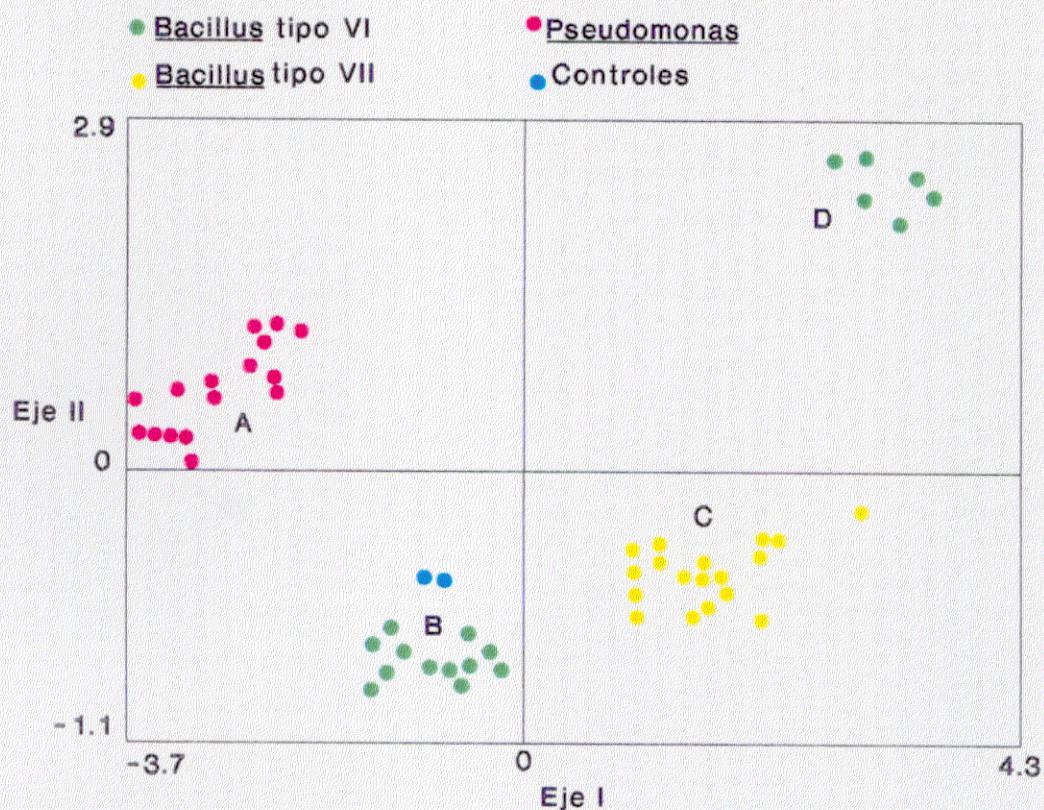


Tabla 6.XXIV. Absorción de varianza de los primeros ejes del ACP realizado con los parámetros de PSN.

Eje	% de varianza	Varianza acumulada
1	74.31428	74.31428
2	17.63288	91.94715
3	4.10910	96.05626
4	2.40308	98.45934
5	1.24300	99.70234
6	0.29766	100.0000

Como se puede observar se separan cuatro grupos claros. Si se consideran los datos que se reflejan en la tabla 6.XXII, podemos comprobar que los dos grupos más separados (el formado por Pseudomonas -grupo A- y por tres cepas de Bacillus VI -grupo D-) están integrados por bacterias que son inhibidoras y activadoras respectivamente. Los controles aparecen próximos a los grupos integrados por los Bacillus VI y VII. También es destacable la falta de discriminación en función de la concentración ensayada y la homogeneidad interna de los grupos.





**Figura 6.16.** Representación de las muestras del ACP efectuado con los resultados de PSN sobre los dos primeros ejes. Los números de orden y sus correspondientes cepas se recogen en la tabla 6.XXII.



La ordenación de las variables según los factores de carga aparecen en la figura 6.17. Los resultados son semejantes a los que describimos en el apartado precedente: aparecen agrupadas hacia los valores positivos del eje I las longitudes de la parte aérea y radical (LA y LR), el número de hojas (NH), el nitrógeno total (NT) y la superficie de la parte aérea (SA) mientras que la superficie radical (SR) aparece localizada en los valores negativos del eje I.

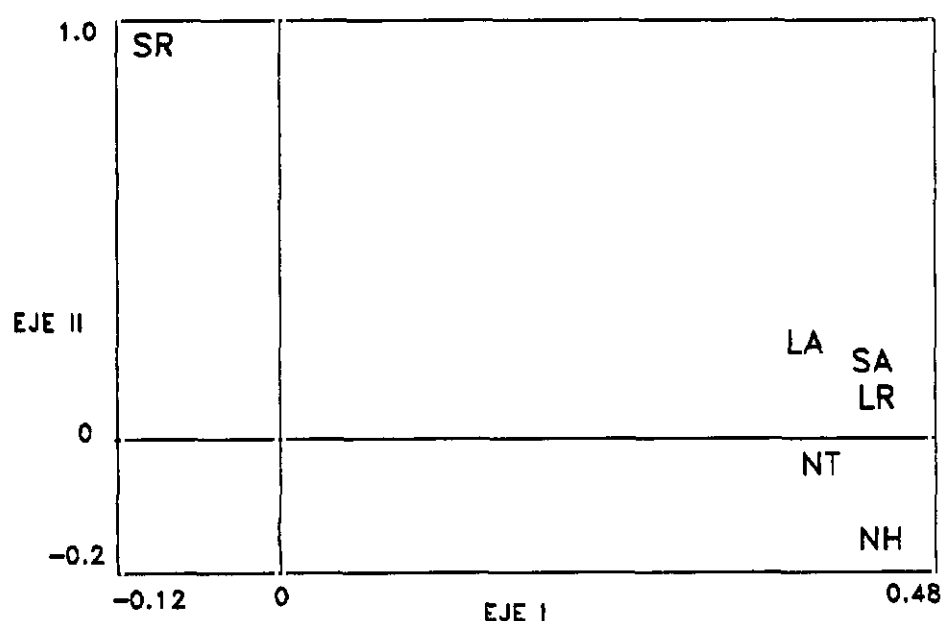


Figura 6.17. Ordenación de las variables según los factores de carga del ACP efectuado con los resultados de PSN sobre los dos primeros ejes (datos en la tabla 6.XXII). Las siglas empleadas son las que se recogen en el texto.

#### 6.4.3. ACP de los resultados en plantas noduladas (PN).

Para el ACP de PN se emplearon los datos recogidos en la tabla 6.XXII, desde el número de orden (NO) 1 hasta el 56, ambos inclusive, resultando así una matriz de 56 x 6. A dicha matriz se añadieron para la elaboración del ACP cuatro nuevas columnas con parámetros que se midieron de forma exclusiva en el caso de las PN: número de lóbulos nodulares, ARA de los nódulos, producción de CO<sub>2</sub> de los nódulos y peso fresco de los mismos. Estas nuevas variables se recogen en la tabla 6.XXV. Las dimensiones de la nueva matriz son de 56 x 10.

Tabla 6.XXV. Datos añadidos para las elaboración del ACP de plantas noduladas. NO: número de orden para ACP, ANOVA y LSDs.

<u>Cepa</u>	<u>NO</u>	<u>Lob. Nodu.</u>	<u>ARA</u>	<u>CO<sub>2</sub></u>	<u>Peso Nod.</u>
O.B.41	1	4.0	751.49	1225.25	0.0151
	2	3.6	741.59	1227.54	0.0143
O.B.45	3	3.6	755.69	1226.78	0.0145
	4	3.6	737.71	1231.26	0.0150
O.B.34	5	5.3	918.98	1234.49	0.0147
	6	3.6	988.82	1246.86	0.0152
O.B.11	7	3.6	755.33	1261.27	0.0152
	8	5.0	750.91	1239.14	0.0142
O.B.33	9	3.6	746.02	1227.98	0.0153
	10	5.0	747.83	1228.86	0.0146
O.B.22	11	3.6	751.70	1287.00	0.0143
	12	4.0	753.05	1240.56	0.0151
O.B.24	13	4.6	757.48	1256.69	0.0144
	14	3.6	755.26	1228.99	0.0143
O.B.25	15	3.6	736.29	1227.20	0.0145
	16	5.0	756.36	1223.22	0.0147
V.P.26	17	7.3	317.71	1542.56	0.0240
	18	9.3	324.67	1546.08	0.0236
V.P.12	19	7.0	322.87	1557.39	0.0243
	20	9.3	327.22	1547.32	0.0235
V.P.21	21	7.6	332.85	1538.89	0.0228
	22	12.3	332.22	1558.95	0.0235
P.B.10	23	3.6	985.84	1224.95	0.0249
	24	3.6	945.55	1232.36	0.0218

Tabla 6.XXV. (continuación)

P.B.8	25	3.6	736.41	1231.68	0.0229
	26	3.6	601.12	1245.07	0.0233
P.B.2	27	3.6	747.10	1252.09	0.0232
	28	4.6	748.69	1251.51	0.0238
I.B.39	29	4.6	756.64	1242.08	0.0146
	30	3.6	751.55	1237.66	0.0142
P.B.13	31	3.6	740.76	1225.52	0.0134
	32	5.0	737.32	1216.44	0.0133
P.P.27	33	8.3	324.52	1535.84	0.0133
	34	13.0	342.87	1547.64	0.0132
P.P.5	35	8.3	345.72	1534.89	0.0136
	36	12.0	345.03	1532.26	0.0136
P.P.2	37	8.6	352.32	1543.83	0.0140
	38	13.6	338.57	1516.11	0.0132
P.P.23	39	8.6	338.70	1578.02	0.0141
	40	12.0	345.32	1546.85	0.0135
I.B.31	41	3.6	997.63	1225.83	0.0147
	42	3.6	986.83	1230.02	0.0152
I.B.14	43	5.0	757.42	1219.81	0.0149
	44	3.6	763.01	1229.58	0.0150
I.B.48	45	4.6	750.11	1228.40	0.0152
	46	3.3	760.68	1233.62	0.0149
I.B.33	47	5.0	763.96	1239.49	0.0152
	48	3.3	763.94	1246.23	0.0153
I.B.47	49	5.0	767.53	1244.06	0.0139
	50	3.6	749.79	1248.45	0.0141
I.B.44	51	5.0	751.93	1242.36	0.0144
	52	3.6	755.89	1255.81	0.0136
I.B.1	53	3.6	753.79	1242.28	0.0147
	54	5.3	752.84	1242.08	0.0169
CNTRL	55	2.6	511.68	990.43	0.0064
	56	2.6	512.76	999.03	0.0096

Unidades y abreviaturas: número de lobulos nodulares (Lob. Nod.); Actividad reductora de acetileno  $\text{nmol C}_2\text{H}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  (ARA); producción de  $\text{CO}_2$  en  $\text{nmol CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$  ( $\text{CO}_2$ ); peso de los nódulos en g (Peso Nod.).

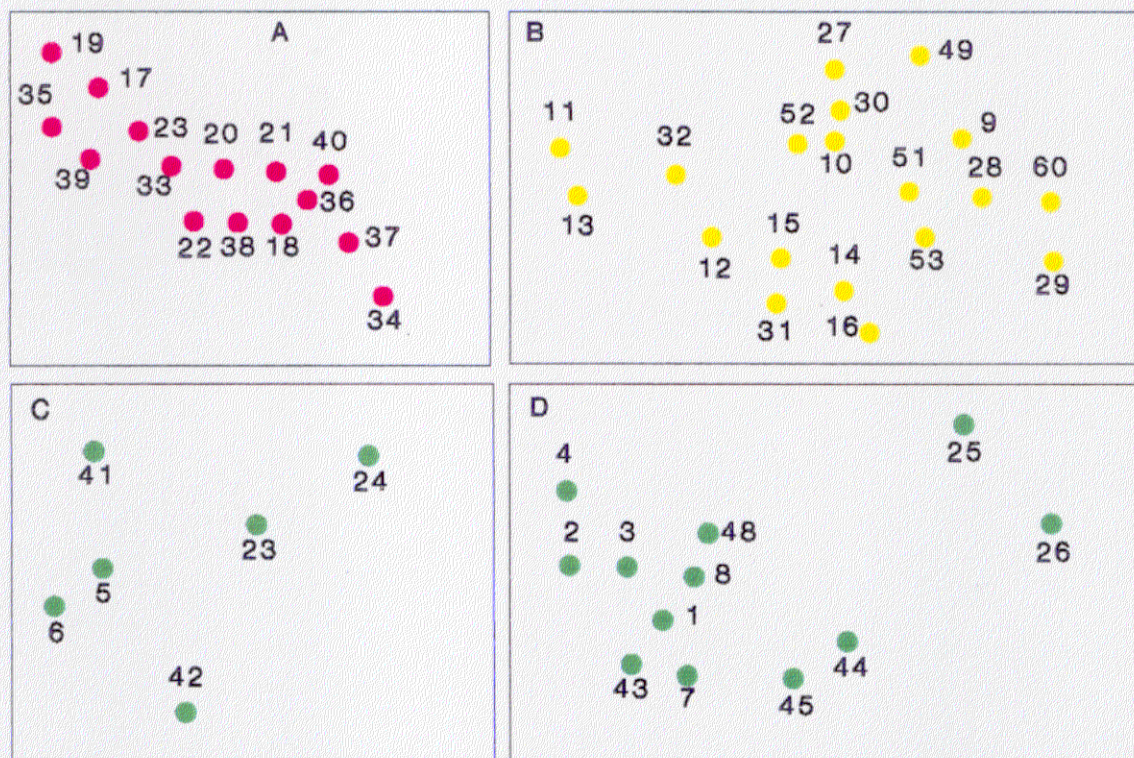
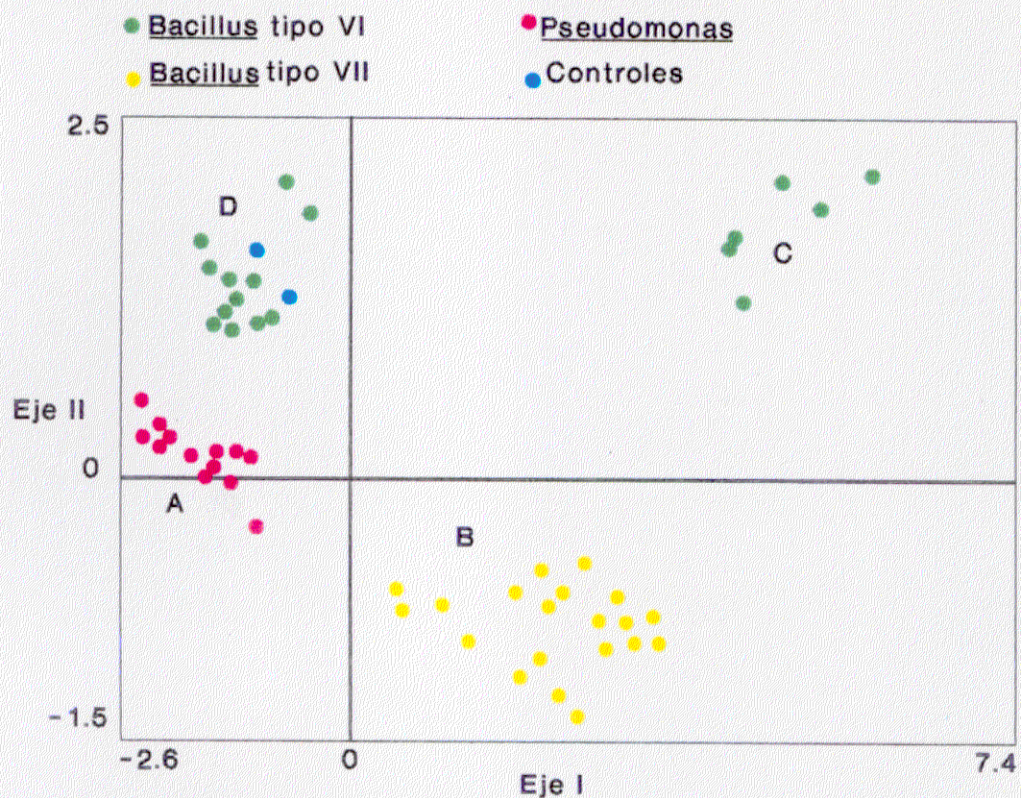
Del ACP se obtiene la ordenación de las cepas que se representa en la figura 6.18. Los dos primeros ejes absorben un porcentaje de varianza del 77.58% y del 12.75% respectivamente (tabla 6.XXVI), por lo que la ordenación de las muestras se refiere a estos dos ejes principales, que absorben, conjuntamente un 90.33% de la varianza total.

Tabla 6.XXVI. Absorción de varianza de los primeros ejes del ACP realizado con los parámetros de PN.

Eje	% de varianza	Varianza acumulada
1	77.58436	77.58436
2	12.75529	90.33966
3	6.26761	96.60727
4	1.95894	98.56711
5	1.08811	99.65522
6	0.34478	100.0000

Como se puede observar (en la figura 6.18) se discriminan cuatro grupos claros análogos a los descritos en el epígrafe precedente. Como en el caso anterior, es destacable la falta de discriminación en función de la concentración ensayada y la homogeneidad interna de los grupos. Si se consideran los datos que se reflejan en las tabla 6.XXII y 6.XXV, podemos comprobar nuevamente que los dos grupos más alejados (el integrado por Pseudomonas -D- y por tres cepas de Bacillus VI -C-) están constituidos por bacterias inhibidoras y activadoras respectivamente.





**Figura 6.18.** Representación de las muestras del ACP efectuado con los resultados de PN sobre los dos primeros ejes. Los números de orden y sus correspondientes cepas se recogen en la tablas 6.XXII. y 6.XXV.



La ordenación de las variables según los factores de carga aparece en la figura 6.19. Hacia los valores más altos del eje I se sitúan las longitudes de la parte aérea y radical (LA y LR), la superficie de la parte aérea (SA) y el ARA (ARA). El número de hojas (NH) se localiza aislado en los valores intermedios del eje I y hacia los negativos del eje II. El resto de las variables es decir, el nitrógeno total (NT), la superficie radical (SR), el número de lóbulos (NL) la producción de CO<sub>2</sub> (CO<sub>2</sub>) y el peso nodular (PN), se localizan hacia los valores positivos del eje II.

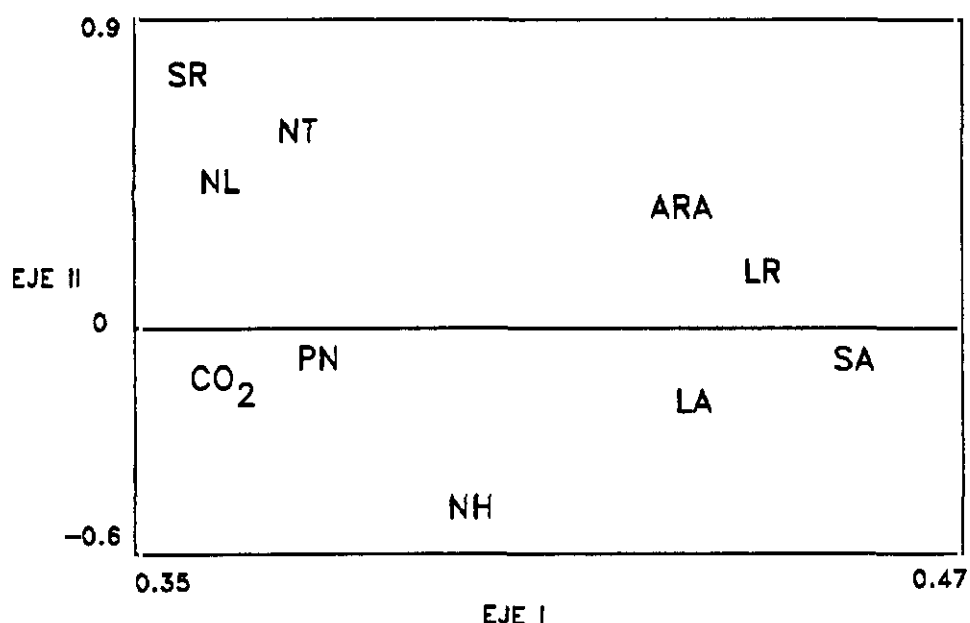


Figura 6.19. Ordenación de las variables según los factores de carga del ACP efectuado con los resultados de PN sobre los dos primeros ejes (datos en las tablas 6.XXII. y 6.XXV). Las siglas empleadas son las que se recogen en el texto.

#### 6.4.4. ANOVAs de los parámetros considerados en los ensayos de plantas sin nodular

Como resultado de los ACPs precedentes se pone de manifiesto una segregación de las cepas bacterianas ensayadas en activadoras o promotoras del desarrollo y crecimiento y las inhibidoras de dichos procesos. Con el fin de establecer la significación estadística de dichas tendencias se efectuaron ANOVAs unidireccionales con réplicas para cada uno de los parámetros considerados. Las cepas empleadas para estos ANOVAS fueron:



\* activadoras (Bacillus tipo VI): O.B.34 (5), P.B.10 (23) e I.B.31 (41)  
 \* inhibidoras (Pseudomonas): V.P.26 (17), V.P.12 (19), V.P.21 (21), P.P.27 (33), P.P.5 (35), P.P.2 (37) y P.P.23 (39). Además se incluyeron los controles (56 y 57 en PN y 114 y 115 en PSN). Los números indicados entre paréntesis corresponden a los empleados en la tabla 6.XXII. Por lo tanto cada uno de los ANOVAs se realiza sobre una matriz de 11 (10 cepas y un control) x 1 (variable analizada), con 6 réplicas, 3 por concentración.

#### 6.4.4.1. Superficie de la parte aérea de las plantas

Los valores medios de los datos sometidos al ANOVA se representan en la figura 6.20. El análisis señala la existencia de diferencias significativas (g.l. 10,55;  $F=188.25$ ,  $p<0.01$ ). El LSD (tabla 6.XXVII), detecta diferencias significativas entre las cepas activadoras e inhibidoras y el control, pero no dentro de cada grupo.

Tabla 6.XXVII. Significaciones del LSD aplicado a los valores medios de superficie aérea en PSN. NS=no significativo; \*= $p<0.05$ ; \*\*= $p<0.01$ )

	5	17	19	21	23	33	35	37	39	41
CNT	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
41	NS	**	**	**	*	**	**	**	**	
39	**	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS		
37	**	NS	NS	NS	**	NS	NS			
35	**	NS	NS	NS	**	NS				
33	**	NS	NS	NS	**					
23	*	**	**	**						
21	**	NS	NS							
19	**	NS								
17	**									

#### 6.4.4.2. Longitud de la parte aérea de las plantas

Los valores medios de los datos sometidos al ANOVA se representan en la figura 6.20. El análisis señala la existencia de diferencias significativas (g.l. 10,55;  $F=173.90$ ,  $p<0.01$ ). El LSD (tabla 6.XXVIII), muestra diferencias análogas a las descritas en el apartado precedente.

Tabla 6.XXVIII. Significaciones del LSD aplicado a los valores medios de longitud aérea de PSN. (NS=no significativo; \*=p<0.05; \*\*=p<0.01)

	5	17	19	21	23	33	35	37	39	41
CNT	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
41	**	**	**	**	NS	**	**	**	**	
39	**	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS		
37	**	NS	NS	NS	**	NS	NS			
35	**	NS	NS	NS	**	NS				
33	**	NS	NS	NS	**					
23	**	**	**	**						
21	**	NS	NS							
19	**	NS								
17	**									

#### 6.4.4.3. Número de hojas

Los valores medios de los datos sometidos a ANOVA se representan en la figura 6.20. El análisis señala la existencia de diferencias significativas (g.l. 10,55; F=54.59, p<0.01). Las diferencias detectadas son, en general, semejantes a las señaladas en los apartados anteriores (tabla 6.XXIX).

Tabla 6.XXIX. Significaciones del LSD aplicado al número de hojas medio de PSN. (NS=no significativo; \*=p<0.05; \*\*=p<0.01)

	5	17	19	21	23	33	35	37	39	41
CNT	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
41	NS	**	**	**	NS	**	**	**	**	
39	**	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS		
37	**	NS	NS	NS	**	NS	NS			
35	**	NS	NS	NS	**	NS				
33	**	NS	NS	NS	**					
23	NS	**	**	**						
21	**	NS	NS							
19	**	NS								
17	**									

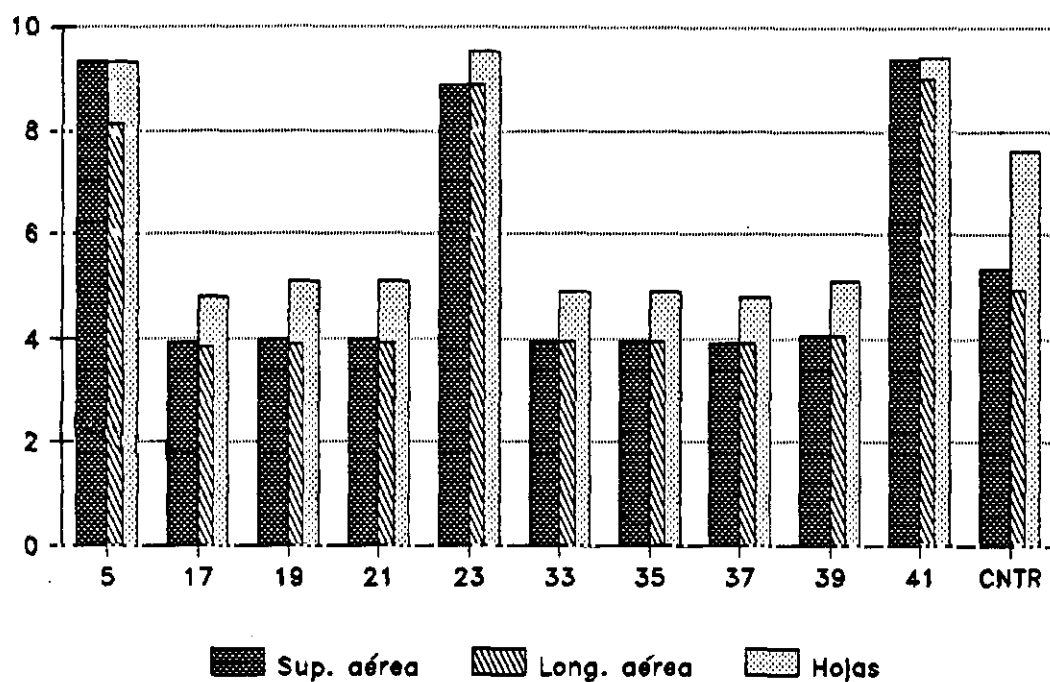


Figura 6.20. Representación de los valores medios (6 réplicas) del efecto de las cepas ensayadas sobre la superficie aérea, longitud aérea y número de hojas en PSN.

#### 6.4.4.4. Contenido en nitrógeno total

Los valores medios de los datos comparados mediante el ANOVA se representan en la figura 6.21. El análisis señala la existencia de diferencias significativas (g.l. 10,55;  $F=25.27$ ,  $p<0.01$ ). El LSD (tabla 6.XXX), detecta diferencias significativas entre las cepas activadoras e inhibidoras y el control y dentro de cada grupo con la excepción de la cepa 41 (I.B.31) que presenta diferencias respecto a las otras dos cepas activadoras.

Tabla 6.XXX. Significaciones del LSD aplicado a los valores medios de nitrógeno total de las PSN. (NS=no significativo; \*=p<0.05; \*\*=p<0.01)

	5	17	19	21	23	33	35	37	39	41
CNT	**	**	**	**	**	**	**	**	**	NS
41	**	**	**	**	**	**	**	**	**	
39	**	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS		
37	**	NS	NS	NS	**	NS	NS			
35	**	NS	NS	NS	**	NS				
33	**	NS	NS	NS	**					
23	NS	**	**	**						
21	**	NS	NS							
19	**	NS								
17	**									

#### 6.4.4.5. Superficie del aparato radical

Los valores medios de los datos comparados mediante el ANOVA se representan en la figura 6.21. El análisis señala la existencia de diferencias significativas (g.l. 10,55;  $F=13.36$ ,  $p<0.01$ ). Como se observa en la tabla 6.XXXI, el LSD muestra diferencias significativas entre las cepas activadoras e inhibidoras y el control, semejantes a las detectadas ellos parámetros precedentes.

Tabla 6.XXXI. Significaciones del LSD aplicado a la superficie radical media de las PSN. (NS=no significativo; \*=p<0.05; \*\*=p<0.01)

	5	17	19	21	23	33	35	37	39	41
CNT	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
41	NS	**	**	**	*	**	**	**	**	
39	*	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS		
37	**	NS	NS	NS	NS	NS	NS			
35	*	NS	NS	NS	NS	NS				
33	*	NS	NS	NS	NS					
23	NS	NS	NS	NS						
21	*	NS	NS							
19	**	NS								
17	**									

#### 6.4.4.6. Longitud del aparato radical

Los valores medios de los datos comparados mediante el ANOVA se representan en la figura 6.21. El análisis señala la existencia de diferencias significativas (g.l. 10,55;  $F=468.39$ ,  $p<0.01$ ). El LSD (tabla 6.XXXII) muestra diferencias significativas entre las cepas activadoras e inhibidoras y el control. En este caso, la cepa 17 (V.P.26) muestra unos resultados análogos en el LSD a los de Bacillus.

Tabla 6.XXXII. Significaciones del LSD aplicado a la longitud radical media de PSN. NS=no significativo; \*= $p<0.05$ ; \*\*= $p<0.01$ )

	5	17	19	21	23	33	35	37	39	41
CNT	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
41	**	**	**	**	**	**	**	**	**	
39	**	**	NS	NS	**	NS	NS	NS		
37	**	**	NS	NS	**	NS	NS			
35	**	**	NS	NS	**	NS				
33	**	**	NS	NS	**					
23	**	**	**	**						
21	**	**	NS							
19	**	**								
17	**									

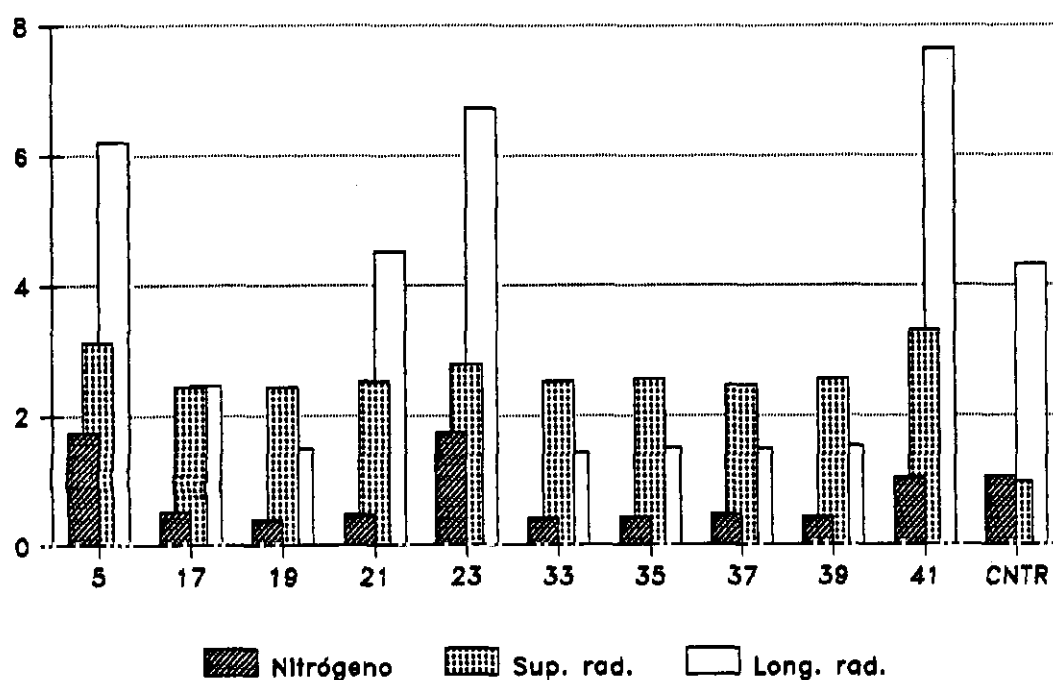


Figura 6.21. Representación de los valores medios (6 réplicas) del efecto de las cepas ensayadas sobre el contenido en nitrógeno, superficie radical y longitud radical en PSN.

#### 6.4.5. ANOVAs de los parámetros considerados en los ensayos de plantas noduladas

Como en el apartado precedente, con el objeto de establecer la significación estadística de las tendencias registradas en el ACP (figura 6.18) se efectuaron ANOVAs unidireccionales con replicas (6 por cepa, 3 de cada concentración ensayada) para cada uno de los parámetros. Las cepas consideradas para estos ANOVAS fueron las mismas que en el apartado anterior.

##### 6.4.5.1. Superficie de la parte aérea

Los valores medios de los datos comparados mediante el ANOVA se representan en la figura 6.22. El análisis señala la existencia de diferencias significativas (g.l. 10,55;  $F=324.82$ ,  $p<0.01$ ). El LSD (tabla 6.XXXIII), muestra diferencias significativas entre las cepas activadoras e inhibidoras y de ambas respecto al control, a excepción de 33, 35, 37 y 39.

Tabla 6.XXXIII. Significaciones del LSD aplicado a las medias superficies parte aérea de PN. (NS=no significativo; \*=p<0.05; \*\*=p<0.01)

	5	17	19	21	23	33	35	37	39	41
CNT	**	**	**	**	**	NS	NS	NS	NS	**
41	*	**	**	**	NS	**	**	**	**	
39	**	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS		
37	**	*	*	*	**	NS	NS			
35	**	NS	NS	NS	**	NS				
33	**	NS	NS	NS	**					
23	*	**	**	**						
21	**	NS	NS							
19	**	NS								
17	**									

#### 6.4.5.2. Longitud de la parte aérea

Los valores de los datos comparados mediante el ANOVA se representan en la figura 6.22. El análisis señala la existencia de diferencias significativas (g.l. 10,55; F=138.36, p<0.01). El LSD (tabla 6.XXXIV), muestra diferencias entre las cepas activadoras (5, 23 y 41) respecto a las inhibidoras y el control.

Tabla 6.XXXIV. Significaciones del LSD aplicado a las medias de longitudes de la parte aérea de PN. (NS=no significativo; \*=p<0.05; \*\*=p<0.01)

	5	17	19	21	23	33	35	37	39	41
CNT	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
41	*	**	**	**	*	**	**	**	**	
39	**	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS		
37	**	NS	NS	NS	**	NS	NS			
35	**	NS	NS	NS	**	NS				
33	**	NS	NS	NS	**					
23	NS	**	**	**						
21	**	NS	NS							
19	**	NS								
17	**									

### 6.4.5.3. Número de hojas

Los valores medios de los datos comparados mediante el ANOVA se representan en la figura 6.22. El análisis señala la existencia de diferencias significativas (g.l. 10,55;  $F=9.90$ ,  $p<0.01$ ). Las diferencias detectadas son en general las señaladas en los apartados anteriores (tabla 6.XXXV), si bien hay que destacar que sólo las cepas activadoras presentan diferencias respecto al control.

Tabla 6.XXXV. Significaciones del LSD aplicado al número de hojas medio de PN. (NS=no significativo;  $*$ = $p<0.05$ ;  $**$ = $p<0.01$ )

	5	17	19	21	23	33	35	37	39	41
CNT	**	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS	NS	**
41	NS	**	**	**	NS	**	**	**	**	
39	**	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS		
37	*	NS	NS	NS	**	NS	NS			
35	**	NS	NS	NS	**	NS				
33	*	NS	NS	NS	**					
23	NS	**	**	**						
21	*	NS	NS							
19	**	NS								
17	**									



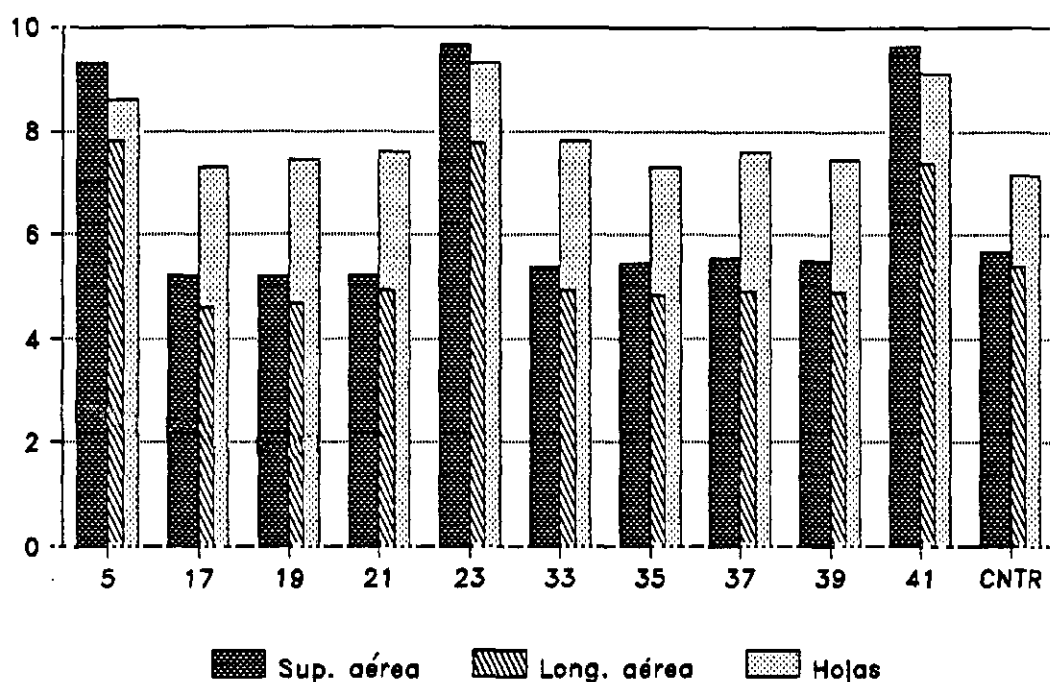


Figura 6.22. Representación de los valores medios (6 réplicas) del efecto de las cepas ensayadas sobre la superficie de la parte aérea, longitud de la parte aérea y número de hojas en PN.

#### 6.4.5.4. Contenido en nitrógeno total

Los valores medios de los datos comparados mediante el ANOVA se representan en la figura 6.23. El análisis señala la existencia de diferencias significativas ( $g.l. 10,55; F=124.83, p<0.01$ ). El LSD (tabla 6.XXXVI), detecta diferencias significativas entre las cepas activadoras e inhibidoras, y de ambas con el control. En este caso no existen diferencias dentro de cada grupo con excepción de la cepa 41 que presenta diferencia respecto a las otras dos cepas activadoras.

Tabla 6.XXXVI. Significaciones del LSD aplicado a las medias nitrógeno total de las PN. (NS=no significativo; \*=p<0.05; \*\*=p<0.01)

	5	17	19	21	23	33	35	37	39	41
CNT	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
41	**	**	**	**	**	**	**	**	**	
39	**	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS		
37	**	NS	NS	NS	**	NS	NS			
35	**	NS	NS	NS	**	NS				
33	**	NS	NS	NS	**					
23	NS	**	**	**						
21	**	NS	NS							
19	**	NS								
17	**									

#### 6.4.5.5. Superficie del aparato radical

Los valores medios de los datos comparados mediante el ANOVA se representan en la figura 6.23. El análisis señala la existencia de diferencias significativas (g.l. 10,55; F=154.45, p<0.01). Como se observa en la tabla 6.XXXVII, se encuentran diferencias significativas entre las cepas activadoras e inhibidoras y el control, en analogía a las detectadas en el parámetro precedente. No existen sin embargo diferencias entre la cepa 33 y el control ni entre las cepas 5 y 41.

Tabla 6.XXXVII. Significaciones del LSD aplicado a la media de superficie radical de las PN. (NS=no significativo; \*=p<0.05; \*\*=p<0.01)

	5	17	19	21	23	33	35	37	39	41
CNT	**	*	*	*	**	NS	*	*	*	**
41	NS	**	**	**	**	**	**	**	**	
39	**	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS		
37	**	NS	NS	NS	**	NS	NS			
35	**	NS	NS	NS	**	NS				
33	**	NS	NS	NS	**					
23	**	**	**	**						
21	**	NS	NS							
19	**	NS								
17	**									

#### 6.4.5.6. Longitud del aparato radical

Los valores medios de los datos comparados mediante el ANOVA se representan en la figura 6.23. El análisis señala la existencia de diferencias significativas (g.l. 10,55;  $F=472.30$ ,  $p<0.01$ ). Como se observa en la tabla 6.XXXVIII, se encuentran diferencias significativas entre las cepas activadoras e inhibidoras y de las primeras respecto al control. No existen sin embargo diferencias dentro de cada grupo.

**Tabla 6.XXXVIII.** Significaciones del LSD aplicado a la media de la longitud radical de las PN. (NS=no significativo; \*= $p<0.05$ ; \*\*= $p<0.01$ )

	5	17	19	21	23	33	35	37	39	41
CNT	**	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS	NS	**
41	NS	**	**	**	NS	**	**	**	**	
39	**	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS		
37	**	NS	NS	NS	**	NS	NS			
35	**	NS	NS	NS	**	NS				
33	**	NS	NS	NS	**					
23	NS	**	**	**						
21	**	NS	NS							
19	**	NS								
17	**									

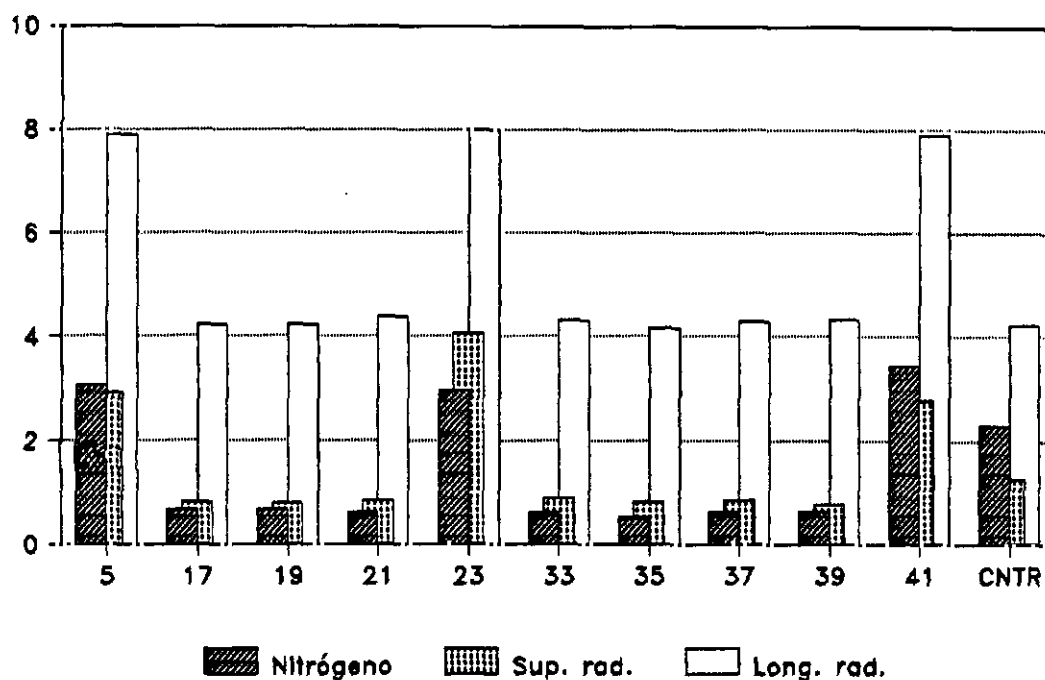


Figura 6.23. Representación de los valores medios (6 réplicas) del efecto de las cepas ensayadas sobre el contenido en nitrógeno, superficie radical y longitud radical en PN.

#### 6.4.5.7. Actividad Reductora del Acetileno (ARA)

Los valores medios de los datos comparados mediante el ANOVA se representan en la figura 6.24. El análisis señala la existencia de diferencias significativas (g.l. 10,55;  $F=394.53$ ,  $p<0.01$ ). Como se observa en la tabla 6.XXXIX, se encuentran diferencias significativas entre las cepas activadoras e inhibidoras y el control. No existen sin embargo diferencias dentro de cada grupo.

Tabla 6.XXXIX. Significaciones del LSD aplicado a las medias del ARA de las PN. (NS=no significativo; \*=p<0.05; \*\*=p<0.01)

	5	17	19	21	23	33	35	37	39	41
CNT	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
41	*	**	**	**	NS	**	**	**	**	
39	**	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS		
37	**	NS	NS	NS	**	NS	NS			
35	**	NS	NS	NS	**	NS				
33	**	NS	NS	NS	**					
23	NS	**	**	**						
21	**	NS	NS							
19	**	NS								
17	**									

#### 6.4.5.8. Producción de CO<sub>2</sub> por los nódulos

Los valores medios de CO<sub>2</sub> comparados en el ANOVA se representan en la figura 6.24. El análisis señala la existencia de diferencias significativas (g.l. 10,55; F=172.38 p<0.01). Como se observa en la tabla 6.XL, se encuentran diferencias significativas entre las cepas de Bacillus y Pseudomonas y el control. No existen sin embargo diferencias dentro de cada grupo.

Tabla 6.XL. Significaciones del LSD aplicado a los valores medios de la producción de CO<sub>2</sub> por los nódulos de las PN. NS=no significativo; \*=p<0.05; \*\*=p<0.01)

	5	17	19	21	23	33	35	37	39	41
CNT	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**
41	NS	**	**	**	NS	**	**	**	**	
39	**	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS		
37	**	NS	NS	NS	**	NS	NS			
35	**	NS	NS	NS	**	NS				
33	**	NS	NS	NS	**					
23	NS	**	**	**						
21	**	NS	NS							
19	**	NS								
17	**									

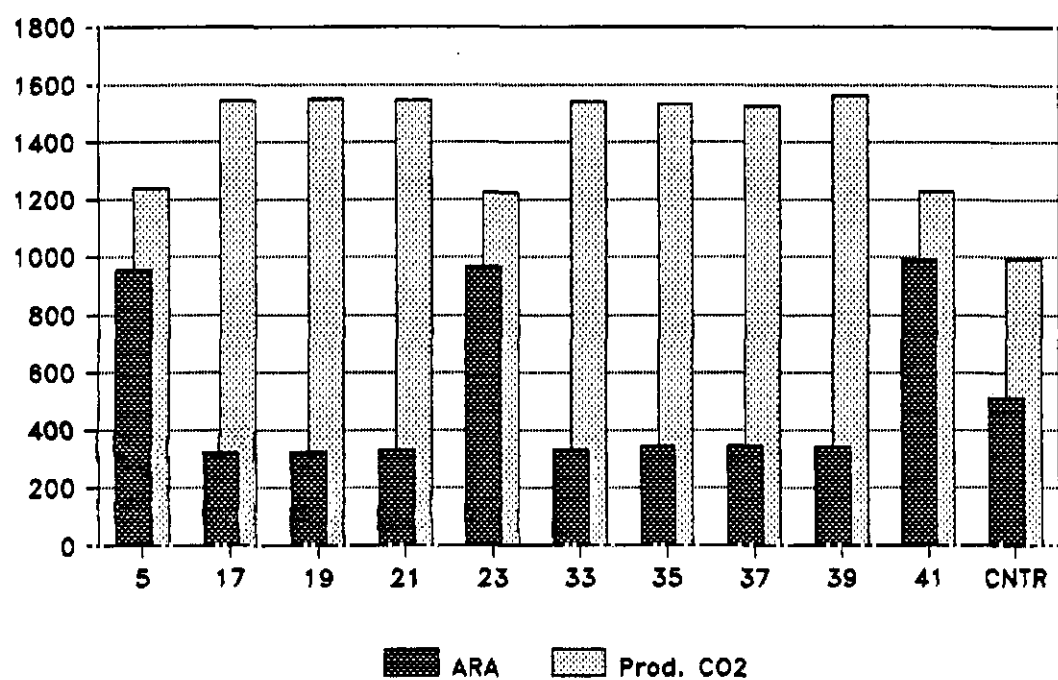


Figura 6.24. Representación de los valores medios (6 réplicas) del efecto de las cepas ensayadas sobre el ARA y la producción de CO<sub>2</sub> por los nódulos de PN.

## **7.DISCUSION DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN EL SENTIDO SUELO-PLANTA.**

### 7.1. Composición bacteriana de la rizosfera de Alnus glutinosa y su variación estacional: grupos taxonómicos y fisiológicos

En este trabajo se realiza un estudio preliminar sobre la composición rizobacteriana y los cambios estacionales de los géneros bacterianos asociados a la rizosfera de Alnus glutinosa (L.) Gaertn así como la función de estos géneros en el ciclo del nitrógeno.

El método seguido para el aislamiento bacteriano, mediante suspensiones-diluciones y posterior siembra de los mismos en medios enriquecidos es un procedimiento estándar en los estudios de microbiología del suelo (Johnson y Curl, 1972). Debido a la complejidad y variabilidad del ambiente radicular, ningún medio de cultivo es adecuado para el crecimiento de todas las especies edáficas, puesto que se desconocen los requerimientos nutricionales de muchas cepas. Por tanto, cuando hablamos del total de bacterias en la muestra de suelo nos referimos a una fracción del total. Sin embargo al ser éste un método seguido por muchos investigadores (Bohem *et al.*, 1993) podemos comparar nuestros datos con los obtenidos por otros autores.

Para la determinación de los géneros bacterianos, hemos seguido el esquema de diagnóstico de Acero *et al.* (1994) en el que se incluyen pruebas bioquímicas y siembra en medios de cultivo selectivos.

Todas las tendencias y diferencias referentes a las frecuencias bacterianas que se discuten están apoyadas por los resultados obtenidos mediante el ACP y ANOVA, indicando éste último la significación de dichas diferencias.

Bacillus y Pseudomonas aparecen, en nuestro trabajo, como los géneros predominantes en la rizosfera de Alnus glutinosa (L.) Gaertn y presentan diferencias significativas (mediante la prueba LSD) con el resto de los géneros (Tabla 6.XII y Figura 6.2). Por otra parte las variaciones estacionales que hemos encontrado son apreciables a pesar de que no aparecen diferencias significativas entre el verano y el otoño, estaciones con mayores diferencias en cuanto a composición bacteriana se refiere. Esto es debido a una compensación entre el número de Bacillus en otoño y el número de Pseudomonas en verano (Figura 6.3). Estudios previos de la microflora rizosférica de diversas plantas, realizados tanto por técnicas de microscopía como por cultivo en placa y posterior determinación, revelan que en general predomina el crecimiento de los



bacilos Gram negativos, no esporulados, sobre todo Pseudomonas y en particular P. fluorescens, mientras que los bacilos gram positivos esporulados y no esporulados así como los cocos Gram positivos no esporulados son menos abundantes en esta zona (Rovira et al., 1974; Campbell, 1985). Otros autores como Chan et al., (1963), Gómez y Sargadoy, (1985), o Salerno y Sargadoy, (1990) han indicado que Bacillus es mayoritaria en el espacio no rizosférico. No obstante Bowen y Foster (1978) encuentran Pseudomonas y Bacillus en la fracción del suelo más próxima a la raíz. Nuestros resultados coinciden con los de éstos últimos autores si bien encontramos una alternancia estacional que responde a factores que trataremos a continuación. En este punto cabe destacar que prácticamente no existen estudios en los cuales se haga un seguimiento temporal de la sucesión bacteriana en el seno de la rizosfera.

Bacillus aparece como predominante en los meses de otoño e invierno, como confirman los LSD de la interacción (Tabla 6.XIII). Tras las estaciones de fotosíntesis más intensa (primavera y verano) la exudación radical aumenta (Whipps y Lynch, 1986). Alexander (1980) ya había descrito este efecto en la rizosfera de leguminosas en las que encontraba mayor cantidad de bacterias capaces de esporular en los meses posteriores a los de mayor actividad del vegetal. Los compuestos exudados por la raíz podrían estimular o inhibir las poblaciones bacterianas presentes en la rizosfera y, en este caso en particular, podrían estar favoreciendo su crecimiento. Por otro lado en otoño aumenta la humedad del suelo lo que favorece la actividad y crecimiento bacteriano (Lund y Goksoyr, 1980; Orchard y Cook, 1983). Bacillus gracias a su capacidad para esporular en condiciones adversas podría permanecer parte del verano en estado de spora y en otoño al aumentar la humedad pasaría a su forma activa. Otros autores ya han señalado el efecto de la humedad sobre la dinámica de la biomasa bacteriana (Kieft et al. 1987) y los efectos de los ciclos sequía-humedad como importantes reguladores de la misma.

Durante el otoño y el invierno las temperaturas descienden lo que afecta al crecimiento de algunas bacterias como Pseudomonas que mueren o permanecen en estado inactivo, por lo que Bacillus podría encontrar unas condiciones de crecimiento favorable al desequilibrarse en su favor las condiciones de competencia con Pseudomonas. Además en los meses más fríos Bacillus puede esporular manteniendo unos efectivos poblacionales sostenidos durante los meses de otoño e invierno. En primavera las condiciones de humedad y temperatura para especies poco resistentes son más favorables. En este momento el porcentaje de Pseudomonas aumenta y empieza a desplazar a Bacillus. Bowen y

Foster (1978) observan que Pseudomonas sp. en la interfase suelo-raíz tiene una generación cada 5.2 h mientras Bacillus sp. cada 39 h. Es decir que cuando las condiciones de humedad, temperatura y nutricionales son las adecuadas Pseudomonas presenta una tasa de crecimiento mayor que la de Bacillus, lo cual puede justificar nuestros resultados.

Las temperaturas en verano son altas y la humedad disminuye considerablemente, Bacillus podría encontrar estas condiciones ambientales poco favorables y esporular. Por este motivo podríamos suponer que la población de Bacillus permanecería constante a lo largo del año, sin embargo observamos un descenso en verano. Dicho descenso podría estar motivado entre otros factores, por una predación por parte de nemátodos y otros organismos presentes en la rizosfera. Por otro lado pueden aparecer competencias en las placas tras la inoculación con las suspensiones-diluciones de suelo, de forma que los fenómenos de competencia que se establecen en el sustrato natural pueden hacerse más patentes en las placas de cultivo por razones de espacio y difusión de productos a través del agar.

Distintos factores abióticos y bióticos podrían estar relacionados con el aumento del género Pseudomonas en primavera y verano (Figura 6.3). Respecto a los factores abióticos, tanto la humedad como la temperatura (Burr y Caesar, 1984; Mathes y Schriefer, 1985; Taylor y Parkinson, 1988) influyen en la actividad bacteriana. Como ya hemos señalado el arroyo de "Las Tórtolas", en cuyos márgenes están situados los alisos estudiados presenta un acusado estiaje. En verano la humedad disminuye drásticamente, por tanto la planta durante estos meses está sometida a un fuerte estrés hídrico, lo que influye en la exudación radical (Martin, 1977 b). Como tratamos con plantas maduras, la autólisis de células de la raíz y la exudación proveen a los microorganismos de nutrientes (como aminoácidos, necesarios para el crecimiento de muchas bacterias) y favorecen el crecimiento de bacterias con alta tasa de crecimiento como Pseudomonas. Todo ello podría explicar el aumento de bacterias de este género (Rouatt y Katznelson, 1961) durante los meses de verano. Por otra parte Pseudomonas es muy sensible a las variaciones de pH (Bazin et al., 1990) y A. glutinosa como otras especies diazotrofas (Pérez Hernández et al., 1989; Pozuelo, 1991) modifica estacionalmente el pH de su rizosfera. El pH del verano, ligeramente superior al del resto de las estaciones es más favorable el crecimiento de Pseudomonas. A pesar del aumento de Pseudomonas en primavera y verano es preciso señalar que las diferencias entre este género y Bacillus no son significativas en ninguna de las dos estaciones, aunque si lo son con respecto a los demás géneros bacterianos.

Streptomyces muestra una estabilidad poblacional a lo largo de todas las estaciones. Dicha estabilidad, indica una acomodación a las variaciones de los factores tanto bióticos como abióticos que mediante su interacción modifican la densidad de las distintas poblaciones bacterianas. Bacterias de este género tienen importancia en los procesos de antagonismo microbiano y en la regulación de la composición de la comunidad edáfica como consecuencia de la capacidad de algunas especies de este género para sintetizar antibióticos (Schipper *et al.*, 1986; Cooksey y Moore, 1980) y producir enzimas que provocan la lisis de hongos y bacterias. Por ello es notable su importancia en la eliminación de patógenos de plantas. Es posible que la estabilidad de Streptomyces pueda estar asegurada por el hecho de poder eliminar competidores mediante la producción de tales sustancias. Este género fue encontrado por Neal *et al.* (1968) en Alnus rubra Bong.

Como se puede observar en el análisis de componentes principales, Micrococcus, Sporosarcina y Bacillus, presentan factores de carga semejantes sobre el eje 1. Su frecuencia máxima la alcanzan en los meses de otoño o invierno. El género Sporosarcina, aparece en suelos y, principalmente en suelos asociados a la actividad humana (Claus, 1981). En la zona de muestreo aumenta la actividad antrópica durante los meses de verano, época en la que este género no alcanzaría sus máximos por competencia con otros, como Escherichia y Serratia. Durante el verano podría quedar en forma de endospora y en otoño aumentar su frecuencia al disminuir la de bacterias pertenecientes a otros géneros. Las bacterias del género Micrococcus presentan como principal hábitat la piel de mamíferos, pudiendo llegar a ser patógenos oportunistas, como hábitats secundarios tiene el agua y el suelo. La detección de estas bacterias debe tomarse con precaución dado que es un contaminante habitual. Las frecuencias máximas aparecen en los meses de otoño e invierno, período en el que el ganado pasta en la zona de muestreo, lo que nos hace pensar en una posible relación entre ambos hechos.

Dos géneros, que se han citado en la rizosfera de distintas plantas (Lievens *et al.*, 1989), incluyen potencialmente especies patógenas: Erwinia (Kloepper, 1983) y Agrobacterium (Cooksey y Moore, 1980) y aparecen fundamentalmente en primavera y verano, estaciones en las que en general se desarrollan los procesos infecciosos. Componentes de los exudados pueden afectar directamente la expresión de genes implicados en la simbiosis y patogenicidad (Peters *et al.*, 1986; Redmond *et al.*, 1986, Shearman *et al.*, 1986; Zaat *et al.*, 1987).

Durante los meses de verano y primavera aparece un incremento de Escherichia y Serratia, que podría deberse a la acción antrópica y a un aumento del vertido de aguas fecales.

Las bacterias mayoritarias son heterótrofas. Todas las cepas estudiadas tienen la capacidad de comportarse como amonificantes. Este dato confirma lo ya indicado por otros (Probanza, 1991) en el sentido de que la rizosfera de las plantas diazotrofas es rica en nitrógeno fácilmente mineralizable, como consecuencia de su liberación por exudación radical. En general podemos decir que la considerable densidad de bacterias amonificantes encontradas en otoño debe ser, por razones de competencia, la causa de la baja densidad de microorganismos de otros grupos funcionales del ciclo del nitrógeno. Una mineralización acusada junto con niveles de humedad elevados (mayores que en verano) conduce a tasas elevadas en el consumo de oxígeno y un descenso de su concentración en el sustrato (Campbell, 1985), lo que conduciría a un aumento de las densidades de microorganismos anaerobios estrictos, facultativos o microaerófilos, como los desnitrificantes y fijadores aerobios.

Por otro lado aparecen también bacterias desnitrificantes cuyo porcentaje aumenta en invierno y primavera. Struwe y Kjoller (1990) encuentran Bacillus y Pseudomonas capaces de desnitrificar, siendo más abundante este último género. Por lo tanto es previsible, en función de estos resultados, que la desnitrificación corra a cargo tanto de bacterias del género Pseudomonas como del género Bacillus. Dorland y Beauchamp (1991) concluyen que la desnitrificación depende sobre todo de la cantidad de carbono disponible, que junto con otros factores explicaría el aumento de desnitrificantes en los meses de invierno y primavera ya que son estos los meses con mayor porcentaje de materia orgánica. Otro factor importante que regula los niveles de desnitrificación es la temperatura (Struwe y Kjoller, 1990). Dicha variable alcanza valores más favorables en primavera, razón por la cual podría aumentar la frecuencia de desnitrificantes en esta estación. En verano los niveles de carbono orgánico son menores, pero aparecen altas concentraciones de nitratos que junto con temperaturas favorables puede conducir a elevados porcentajes de desnitrificantes.

A pesar de que todas las bacterias pertenecientes a los géneros Pseudomonas y Bacillus muestran actividad amonificante en todas las épocas de muestreo hay una diferencia cualitativa importante entre el otoño y el resto de las estaciones; aparecen cepas que además de mineralizar desnitrifican lo que

puede indicar un cambio en el tipo de mineralización. Mientras que en otoño el metabolismo debe ser básicamente aerobio en el resto de las estaciones la variedad de microhabitats aumenta lo que permite la aparición de zonas aerobias, anaerobias y microaerófilas. Los resultados confirman lo ya indicado por otros autores, el suelo es un sistema de gran complejidad en el que además de las interacciones biológicas el sustrato físico proporciona una riqueza enorme de hábitats con características muy distintas, incluso opuestas en muchos sentidos, que pueden coexistir en el mismo sustrato permitiendo el desarrollo de organismos con metabolismo y requerimientos diferentes.

En verano encontramos un incremento apreciable del número de bacterias capaces de fijar nitrógeno. Lo más llamativo es el aumento del número de bacterias capaces de realizar tres funciones de las cinco estudiadas; amonificación, desnitrificación y fijación aerobia que no aparecen en otoño y primavera y alcanzan un 2.13% y un 7.41% en invierno y verano respectivamente coincidiendo con el aumento más llamativo de Pseudomonas. Sin embargo las bacterias capaces de amonificar y fijar nitrógeno en condiciones aerobias están representadas en mayor o menor proporción en todas las estaciones, por lo que no podemos inferir ninguna deducción al respecto.

Los resultados obtenidos en el estudio de los grupos funcionales del ciclo del nitrógeno deben ser tomados con las debidas precauciones, ya que una bacteria aislada en medios de cultivo sintéticos puede mostrar actividades difíciles de interpretar desde un punto de vista funcional en su sustrato natural si consideramos dichas actividades simultáneamente. Sin embargo no cabe duda de que si muestra su capacidad en el laboratorio, en condiciones naturales puede realizarla aunque no entremos a considerar en que medida.

## **7.2. Efectos de las cepas de Bacillus y Pseudomonas sobre la germinación**

El primer aspecto que conviene abordar respecto a los ensayos de germinación es sobre el sujeto de la experiencia. Las semillas empleadas no muestran (véanse figuras 6.9., 6.10. y 6.11) ninguna variación en las bandas que aparecen en las electroforésis de proteínas de reserva, independientemente de la procedencia temporal o geográfica de las mismas. Esto nos permite pensar que, el posible efecto debido a la variación genética entre semillas no ha de tener prácticamente relevancia. En este sentido Montoya (1992) detecta variaciones en la velocidad de germinación y crecimiento en los primeros estadios

de crecimiento de Vicia villosa según la presencia o ausencia de determinadas proteínas de reserva.

El control de esta variable es muy importante ya que el efecto de un factor externo sobre la germinación puede ser muy distinto según el genotipo sobre el que actúe. La preocupación por este tema está pues plenamente justificada como así lo corrobora el hecho de ser usual el empleo de clones de Alnus glutinosa, por ejemplo en los estudios de nodulación (Hendrickson *et al.*, 1993) con el fin de minimizar la variación interindividual en los ensayos. Esto responde a que Alnus, como el resto de las betuláceas, es una planta anemófila por lo que puede ser extremadamente variable (Hahn *et al.*, 1988). En este trabajo nos habríamos visto obligados a fijar dicha variable si se hubiese confirmado a través de las electroforesis realizadas con las proteínas de reserva, sin embargo como ya hemos señalado muestran una extrema homogeneidad. A la vista de lo cual podemos concluir que existe una gran uniformidad genética interna de las poblaciones estudiadas. Además esta homogeneidad puede abarcar a conjuntos de poblaciones que se desarrollen en un territorio relativamente extenso como ponen de manifiesto los estudios de Ager *et al.* (1993) que al estudiar poblaciones de Alnus rubra Washington y Oregón no detectan serias diferencias.

En lo que respecta a la metodología para los ensayos de germinación, hay que señalar que permite una eficiente y rápida constatación del proceso de germinación y por otra un manejo aséptico de las semillas, minimizando la posible contaminación de las mismas. Otros autores han empleado otros soportes diferentes al agar, tales como vermiculita o arena, si bien hay que señalar que en estos ensayos biológicos se probaba el efecto directo de bacterias (no del medio de crecimiento de estas) sobre plantas ya germinadas. Otras dos ventajas adicionales son por una parte que el soporte (agar) permite diferenciar con claridad la emergencia de la radícula y por otra la difusión de los compuestos presentes en los medios bacterianos ensayados.

Los resultados obtenidos en esta experiencia, nos muestran 2 hechos importantes:

- (i) Se detecta un claro efecto sobre la germinación, diferente en el caso de las cepas de Bacillus al de Pseudomonas.
- (ii) Las cepas de Pseudomonas se muestran claramente inhibitoras de la germinación tanto si se ensaya el medio de cultivo al 10% como al 20%, mientras que los Bacillus tipo VI sólo aceleran la germinación al 20%.

Indudablemente la inhibición detectada en presencia del medio de cultivo en el que crecieron las cepas de Pseudomonas se debe a la presencia en el mismo de metabolitos responsables del efecto, que pueden actuar individualmente o de forma combinada. Esta inhibición se detecta en dos aspectos: una reducción del número de semillas germinadas (5 por réplica como máximo) y la demora en la germinación hasta el 4º ó 5º día desde el inicio del ensayo. Son muchos los trabajos en los que se ha estudiado el efecto inhibitorio de diferentes cepas del género Pseudomonas y cómo afectan al crecimiento y germinación de distintas especies de plantas. La causa más frecuente de la inhibición es la producción de HCN, este efecto, según Lambers (1985) se debe a que el HCN afecta sobre todo al metabolismo energético celular al inhibir la citocromo oxidasa, si bien en general afecta a todas aquellas enzimas que poseen algún átomo metálico (Solomonson, 1981). La producción de HCN por Pseudomonas depende fundamentalmente de los tipos de aminoácidos presentes en el medio de crecimiento de la bacteria. Parece que esta vinculada la formación de HCN a la presencia de altas concentraciones de prolina. También modula el proceso las concentraciones de hierro y fósforo en el medio (Schippers et al., 1991).

El ión hierro, en su forma férrica, puede afectar a la producción de otros metabolitos también producidos con cierta frecuencia por bacterias del género Pseudomonas: los sideróforos. La mayoría de las cepas del género productoras de sideróforos están catalogadas como cepas beneficiosas para las plantas.

Este efecto en realidad se verifica de un modo indirecto puesto que los sideróforos actúan sobre organismos patógenos de plantas, fundamentalmente hongos (Lamanceau y Alabouvette, 1993).

Sin embargo si consideramos el posible efecto de estos compuestos en ausencia de estos patógenos, como es el caso de los ensayos que hemos efectuado, el efecto beneficioso sobre las plantas, se puede invertir: los sideróforos podrían quelar el hierro, éste dejaría de estar a disposición de la planta, afectando negativamente a su desarrollo. En este sentido Derylo y Skorpuska (1993) comprueban que una cepa de Pseudomonas, promueve el crecimiento de plantas de Trifolium sp., sólo previa inhibición de la formación de sideróforos por la adición al medio de crecimiento de las bacterias FeCl<sub>3</sub>. La causa directa de la inhibición de la germinación por las cepas ensayadas sería difícil de determinar aún cuando se demostrase la presencia de HCN o de sideróforos en el medio de cultivo, ya que como se ha indicado anteriormente estas sustancias pueden actuar en combinación con otras que fácilmente se

pueden producir en un medio de cultivo complejo como el empleado. Por otra parte la demostración "in vitro" de este efecto es un punto de referencia obligado antes de acometer ensayos de campo en los cuales el número de variables que inciden sobre el metabolismo bacteriano (tipo de sustrato orgánico, textura del suelo y su incidencia en la difusión de nutrientes y oxígeno, competencia con otros organismos, etc.) es tan elevada que cada experiencia constituye por si misma un dato irrepetible en función, básicamente, del componente edáfico. Por esta razón las experiencias de campo se deben efectuar con bacterias previamente seleccionadas según unas pruebas precisas y particulares para cada caso particulares.

Como ya se ha mencionado anteriormente, la totalidad de las cepas de Bacillus tipo VI al 20% activan de un modo claro la germinación. La activación alcanza significación estadística a una concentración del 20%, al 10% se aprecia una activación estadísticamente no significativa.

En cuanto a los efectores del fenómeno detectado, podemos considerar varios aspectos: un primer hecho notable es que sea cual sea el agente responsable de la activación, es capaz de atravesar la capa externa de la núcula. Este hecho probablemente esté en relación con el reblandecimiento que sufre como consecuencia del proceso de vernalización aunque no podemos descartar el efecto de la esterilización superficial de las semillas por hipoclorito.

Por otra parte cabe pensar que la molécula o moléculas efectoras no son de elevado peso molecular al ser capaces de atravesar las cubiertas de la semilla en las condiciones ensayadas.

Son abundantes las citas bibliográficas que hacen referencia a numerosos microorganismos edáficos productores de hormonas vegetales (Brown, 1972). Sin embargo, tal y como se discutirá más adelante, la mayor parte de estos estudios se interesan en el efecto de las hormonas sobre crecimiento y desarrollo y muy pocos del efecto sobre la germinación (Lynch, 1990).

Las principales fitohormonas implicadas en la germinación de un modo directo son giberelinas (GB) citoquininas (CK) y etileno. El efecto de estas hormonas se ha corroborado no sólo por su acción endógena (producida por la propia semilla a causa de determinadas condiciones ambientales) sino también exógeno (en experiencias "in vitro"). Podemos considerar fundamentalmente las GB y CK como posibles candidatas a estar presentes en los medios de crecimiento bacteriano, y descartar la presencia de etileno, fundamentalmente por su naturaleza gaseosa. Otro grupo hormonal numerosas veces citado como



metabolito de bacterias son las auxinas. Estas no ejercen un efecto directo sobre la germinación sino sobre procesos de crecimiento por elongación. Podemos suponer que de estar presentes este tipo de metabolitos en los medios de crecimiento ensayados se detectaría, probablemente, una aparente aceleración del proceso de emergencia de la radícula y por ello una aceleración de la germinación. Abundando en esto, como discutiremos más adelante, en los resultados de los ensayos de crecimiento con Bacillus parece posible que existan al menos algunas cepas productoras de auxinas.

Otros compuestos que probablemente estén presentes en los medios de crecimiento bacteriano son algunos iones como el nitrato. Este ión (junto al nitrito) pueden actuar como activadores indirectos de la germinación al acelerar el final del proceso de dormición de la semilla.

Un último aspecto que podemos considerar como un factor más que podría estar implicado en los procesos descritos son algunos compuestos de bajo peso molecular como el ión  $CN^-$ , producido por bacterias, que si bien desde otros puntos de vista es definitivamente tóxico, se ha demostrado a bajas concentraciones como un eficaz acelerador del final del proceso de dormancia. No obstante parece poco probable que esta sea la causa de la aceleración en la germinación de semillas tratadas con medios de crecimiento de los Bacillus ensayados, basándonos en los resultados obtenidos en los ensayos de crecimiento que a continuación discutiremos.

### 7.3. Efectos de las cepas de Bacillus y Pseudomonas sobre el crecimiento de plantas noduladas y sin nodular

Son innumerables los trabajos realizados sobre la rizosfera desde que quedó definida por Hiltner en 1904. Como consecuencia de los mismos se ha reconocido el relevante papel del componente biótico del sistema rizosférico sobre la producción primaria y la capacidad productiva del suelo. A partir de la década de los sesenta se comenzaron a realizar experiencias sobre el papel de las bacterias rizosféricas en la producción vegetal y desde los ochenta este tipo de investigaciones han cobrado suma importancia por su aplicación al campo de la biotecnología (Mishustin y Naumova, 1962; Geels y Schippers, 1983; De Freitas et al., 1993). Los planteamientos del diseño experimental en estos trabajos se pueden resumir en:

(i) Selección de bacterias rizosféricas de una especie de interés agronómico o forestal y ensayo sobre plantas testigo o sobre la misma planta (p.e. Kloeper *et al.*, 1980). En ambos casos los ensayos se hacen en condiciones estériles o en condiciones de campo.

(ii) Crecimiento "in vitro" de cepas beneficiosas o patógenas con el fin de establecer que agente es el responsable de dicho efecto (p.e. Fuentes-Ramírez *et al.*, 1993).

La problemática experimental que se aprecia en todos estos trabajos es compleja pues la forma de establecer la relación entre la cepa o cepas objeto del ensayo con la planta es muy variable. Nosotros consideramos que este tipo de estudios debe de tener dos vertientes: una primera en la que se determine la potencialidad bacteriana para producir metabolitos perjudiciales o beneficiosos y otra posterior en la que se estudien aspectos como la capacidad de colonización de dichas bacterias sobre el sistema radicular, considerando los problemas de competencia con otros organismos, tipo de inóculo, permanencia en el sustrato edáfico, etc. Por este motivo nos planteamos el diseño experimental de esta parte del presente trabajo desde el primer punto de vista, ensayando 2 concentraciones del medio de crecimiento de cepas bacterianas recolectadas de rizosfera de alisos crecidos en condiciones naturales, sobre plantas de dicha especie.

Entre los soportes físicos empleados para el crecimiento del vegetal en condiciones de laboratorio los más habituales son arena, suelos sintéticos o cultivos hidropónicos. En nuestro caso utilizamos como soporte vermiculita que es empleado con poca frecuencia por otros autores. Elegimos dicho soporte por un doble motivo: en primer lugar porque mantiene de un modo constante la humedad sin que sea excesivamente baja la  $pO_2$ , que como es sabido incide en funcionalidad de nódulos (Arrese-Igor *et al.*, 1993) y raíces; en segundo lugar por no afectar nutricionalmente a las plantas al tratarse de un soporte inerte.

En lo que respecta al medio de nutritivo para las plantas se ha empleado un medio simple, Crone, de eficacia bien contrastada, en numerosas estudios en los que están implicadas plantas diazotrofas (Bermúdez de Castro, 1976).

Como ocurriese en los ensayos de germinación, un requerimiento importante es la homogeneidad de las plantas. Esta uniformidad se ha probado a través de la variabilidad en las proteínas de reserva tal y como discutimos anteriormente. Hemos de señalar que aparte de los experimentos que forman

parte del cuerpo de este trabajo, se efectuaron ensayos previos para establecer si existía homogeneidad biométrica entre plantas procedentes de semillas de la misma colección de las que se usarían en dichos ensayos.

Así mismo hemos empleado plantas jóvenes en los ensayos, fundamentalmente por detectarse de un modo rápido y claro cualquier efecto inducido, de un modo mucho mas nítido que en plantas más desarrolladas (Geels et al., 1986).

El primer aspecto que procede discutir son los resultados obtenidos en el ACP realizado con los datos conjuntos de PN y PSN (figura 6.14). Cabe destacar que el efecto de las cepas ensayadas tiene preponderancia respecto a las concentraciones empleadas de los medios de cultivo, sin embargo las respuestas en las variables biométricas encontradas son distintas según se trate de PN o de PSN en el caso de que las bacterias sean inhibitorias y no se diferencian cuando son activadoras. Conviene señalar que cuando hablamos de cepas activadoras e inhibitoras lo hacemos en términos generales al considerar la segregación que observamos como resultado del ACP, sin hacer referencia a ningún parámetro en particular. Posteriormente se comentarán cada una de ellos al discutir los resultados de los ANOVAs efectuados en cada caso.

En función de los factores de carga asignados a las variables estudiadas (figura 6.15) se puede apreciar que la superficie radical es el carácter con más peso para discriminar las cepas tanto inhibitoras como activadoras del resto y la segregación entre ellas por el resto de los parámetros, especialmente la longitud radical y la superficie de la parte aérea. En PSN apreciamos en el caso de las cepas inhibitoras una clara disminución de la longitud radical que no es proporcional a la disminución de la superficie radical (figura 6.21), lo que indica una mayor ramificación del aparato radical que toma contacto con un volumen de medio de crecimiento menos profundo y más extendido en superficie. Algo semejante ha sido descrito en presencia de metales pesados y de exceso de concentración de hormonas (Lonegan, 1975; Ozolina, 1991). Este efecto se ha interpretado como una estrategia de las plantas encaminada a la búsqueda de espacios libres del efecto inhibitorio o tóxico. A diferencia de los ensayos de germinación las concentraciones ensayadas de medio de crecimiento bacteriano no parecen tener gran incidencia o esta queda enmascarada por los otros dos factores. Este hecho apoya uno de los aspectos sobre los que se incidió anteriormente y es que la sustancia o sustancias responsables de los efectos estudiados tienen que atravesar, en el caso de las semillas, las barreras

protectoras del embrión por lo que la variable concentración tiene un efecto más acusado que cuando actúa a través del aparato radical de la planta, en cuyo caso la concentración menor supera el umbral de acción. En PN la situación es bien distinta. Se puede apreciar una apreciable disminución de la superficie radical sin variaciones significativas en la longitud radical. Este efecto puede tener consecuencias especialmente negativas en plantas que necesitan nódulos para proveerse de nitrógeno, ya que este no se suministra al medio de crecimiento (Crone sin nitrógeno). La razón es que la infección por parte del endófito se produce a través de los pelos radicales, por lo que una pérdida de raíces laterales, ricas en pelos epidérmicos conduciría a una carencia en nitrógeno por falta de eficacia en la nodulación, aunque también se aprecia una disminución del ARA en los nódulos existentes. Como consecuencia de todo ello los niveles de nitrógeno total son bajos. Podemos por lo tanto señalar un efecto inhibitorio-tóxico por parte de las cepas de Pseudomonas que se manifiesta de distinta forma en PSN que en PN, lo que podemos atribuir a las especiales características fisiológicas que presentan las plantas con nódulos en sus raíces.

A la vista de estos resultados se efectuó, tal y como se describe en el capítulo 3, dos nuevos ACPs, separando por una parte los resultados de PN y por otra los de PSN. En los dos casos (véanse figuras 6.16 y 6.18), se repite una clara segregación entre cepas activadoras, inhibidoras e indiferentes. Nuevamente no se puede discriminar efecto alguno de la concentración de medio de crecimiento bacteriano ensayada. Al realizar el ACP con los datos obtenidos en los ensayos con PSN, apreciamos de nuevo una clara separación entre inhibidoras y activadoras. En este caso, la segregación es más evidente, debido a la desaparición de los grupos C3 y C1 (figura 6.14). Por lo tanto todas las consideraciones realizadas sobre el anterior ACP se pueden aplicar a este.

El efecto inhibidor encontrado en las cepas de Pseudomonas y activador en las cepas de Bacillus tipo VI se corrobora con los ANOVAs unidireccionales efectuados con cada una de las variables biométricas estudiadas. Todos los parámetros considerados presentan diferencias estadísticamente significativas entre las cepas activadoras y las inhibidoras, por lo tanto a través de los ANOVAs no podemos dilucidar el factor de más peso, aunque se confirma la significación estadística de los grupos generados por el ACP.

La inhibición inducida por las cepas de Pseudomonas se puede deber a varias razones. La producción de HCN puede ser una de las causas del efecto. Este compuesto ha sido detectado en los medios de cultivo de numerosas cepas

del género Pseudomonas (Alström, 1987), y, como ya se señaló, su acción negativa sobre el metabolismo vegetal reside en su capacidad para bloquear el funcionamiento de enzimas implicadas en la respiración celular.

Pese a que en un primer momento puede resultar aparentemente contradictorio, otro posible mecanismo de la inhibición detectada es la producción de IAA. Concentraciones relativamente bajas de IAA aplicadas en raíces pueden inducir a la formación de etileno que da lugar a la inhibición de la elongación (crecimiento) del aparato radical (Chadwick y Bury, 1987). Sin embargo el hecho de detectar una evidente disminución del crecimiento de toda la planta (superficie y longitud de la parte aérea, fundamentalmente) junto a los resultados de germinación y los que más adelante discutiremos respecto a PN, nos inducen a pensar que el efecto está causado por un agente inhibidor como el HCN. Si se tratase de una inhibición del crecimiento del aparato radical de tipo hormonal como la que discutimos (producción de etileno, inducida por auxinas) probablemente no sería tan acusada la reducción de la biomasa aérea.

Conviene señalar que existe cierta discusión en lo que se refiere a la producción "in vitro" de HCN por parte de Pseudomonas. Schippers *et al.* (1986a) apuntan que una rizobacteria del género citado productora del compuesto deletéreo "in vitro", en condiciones de campo puede no producirlo. Sin embargo Alström (1987) encuentra que las cepas de Pseudomonas que ensaya sobre diferentes plantas producen HCN tanto "in vitro" como "in vivo".

Resulta pues interesante hacer algunas consideraciones acerca de la reducción de nitrógeno total en las plantas tratadas con los medios de cultivo de las cepas inhibidoras junto con la reducción de los valores de las variables biométricas ensayadas. Podemos suponer que la inhibición en los parámetros biométricos sea resultado de una dificultad en captar nitrógeno y por ello desarrollar una serie de deficiencias (fundamentalmente enzimáticas) que reduzcan la capacidad de crecimiento. En este sentido hay que señalar un proceso más o menos acusado de clorosis, que se detectó especialmente en las hojas más maduras. Otro dato adicional a este respecto es la aparición de cierta coloración purpúrea en el peciolo de algunas plantas tratadas con ciertas cepas (p.e. V.P.12). Esta coloración es habitual en plantas crecidas en condiciones limitantes de nitrógeno, que conducen a la formación de antocianos. No obstante este hecho se debe tener en cuenta con precaución puesto que la tonalidad púrpura en peciolos de Alnus glutinosa, se da en muchas ocasiones como rasgo característico de la especie. En resumen, la clorosis afectaría directamente a la fijación de CO<sub>2</sub> y por ello al crecimiento de la planta.

Es posible que conjuntamente con los procesos descritos se esté produciendo una sustracción de hierro u otro micronutriente por agentes quelantes o adsorbentes de los mismos, producidos por muchas cepas de Pseudomonas. Los sideróforos han sido detectados en numerosas cepas rizosféricas del género. Estos compuestos afectan, en ausencia de microorganismos patógenos al desarrollo de la planta, al sustraer el metal que deja de ser accesible para la misma (Kloepper, 1979). Este posible déficit de hierro también se traduce en una sintomatología análoga a la descrita para el nitrógeno, es decir procesos de clorosis.

Las tres cepas de Bacillus tipo VI encontradas como activadoras al ensayarlas sobre PSN, porovocan, en todos los casos, un significativo incremento de todos los parámetros biométricos y químicos considerados en las plantas empleadas para el ensayo biológico, respecto al control. Ha de existir algún compuesto en los medios de crecimiento de estos Bacillus implicado (ya sea de modo directo o indirecto) en el desarrollo y crecimiento de las plantas testadas. Como ya apuntamos en al discutir los resultados de germinación, la familia de compuestos que con mayor probabilidad de ser responsables de estos efectos son las auxinas. La capacidad de síntesis de auxinas ha sido descrita en diferentes bacterias epifíticas (Libbert y Rich, 1969) y microorganismos edáficos (Brown, 1972; Prikryl et al., 1985). Los efectos inducidos se detectan, como es nuestro caso, con mayor claridad en plantas en los primeros estadios de desarrollo (Geels et al., 1986). El caso de las auxinas sería lo que podríamos considerar como un activador directo, es decir que afecta precisamente a los procesos fisiológicos que conduzcan al crecimiento de la planta.

Otro conjunto de compuestos que pudieran ser responsables de estos efectos son las vitaminas. Si suponemos que las cepas de Bacillus promotoras de crecimiento son productoras de vitaminas, se podría concluir que los efectos detectados son simplemente "correctores de carencias" del medio de crecimiento de las plantas, es decir que el efecto activador respecto al control no sería detectable si este tuviese una concentración de vitaminas determinada. Este dato es muy importante pues en condiciones de campo se puede establecer algún tipo de relación planta-bacteria basada en una interdependencia trófica. Este hecho redundaría en la complejidad del medio rizosférico y en la sutil selección que existe entre los integrantes de dicho medio (Curl y Truelove, 1986; Lynch, 1990).

Si consideramos como en el caso de Pseudomonas la relación entre el contenido en nitrógeno total y los parámetros biométricos, podemos concluir que en el caso de las plantas tratadas con medios de crecimiento de Bacillus se están produciendo uno de estos dos procesos:

(i) se está optimizando la captación de nitrógeno mineral por la planta, y esto causa un incremento respecto al control de los parámetros biométricos estudiados o,

(ii) Se está poniendo a disposición de las plantas cantidades extra de nitrógeno asimilable por la planta al adicionar los medios de crecimiento de Bacillus dónde sin duda se han verificado procesos de mineralización de la materia orgánica nitrogenada.

Consideramos mas improbable (ii), dado que como discutiremos más adelante, al ensayar plantas noduladas no se observa una inhibición de la actividad fijadora. Esta inhibición indica que en el medio existen cantidades suficientes de amonio que hacen innecesaria la fijación de nitrógeno. Por otro lado el caso (i) no entra en conflicto, sino mas bien justifica las causas últimas de la activación del crecimiento como puede ser la producción de auxinas y/o vitaminas que conduce a mejor desarrollo del aparato radical.

En los ensayos efectuados con PN encontramos dos aspectos fundamentales respecto a los realizados con PSN:

(i) se marcan diferencias en cuanto a los valores de los distintos parámetros medidos, siendo en general superiores (tanto en biométricos como químicos) en PN, tanto en presencia de los medios de Pseudomonas como de Bacillus.

(ii) Los efectos detectados en los ensayos con PN son análogos a los detectados con PSN, tanto respecto a procesos de activación como de inhibición: las cepas de Pseudomonas se muestran como inhibidoras de crecimiento en tanto que las de Bacillus exhiben un efecto activador; al considerar los diferentes parámetros biométricos y químicos se encuentra en general, salvo contadas excepciones, que las Pseudomonas no presentan diferencias significativas entre si y si lo son respecto a Bacillus, si bien estos muestran (eventualmente) diferencias entre ellos.

Conviene pues centrar esta discusión en lo que aportan los nuevos datos sobre lo discutido anteriormente. Por este motivo consideramos a continuación los parámetros diferenciales respecto a los ensayos con PSN, es decir, los nódulos radicales, la actividad fijadora (ARA), la producción de CO<sub>2</sub> y el parámetro relacionado con todos ellos, es decir el contenido en nitrógeno total.

En el caso de Pseudomonas encontramos como datos más característicos a considerar que se detecta (respecto a Bacillus y al control) un ARA inferior, una mayor producción de CO<sub>2</sub> por parte de los nódulos, un menor contenido en nitrógeno total y una mayor cantidad y volumen de los nódulos o lóbulos nodulares.

El hecho de encontrar bajas concentraciones de nitrógeno en las plantas ensayadas con medios de Pseudomonas esta en relación con la baja actividad fijadora detectada a través del ARA. La inhibición de esta actividad (al menos parcial) puede estar vinculada a algún agente ya considerado anteriormente. En los nódulos se detecta (al ensayar cualquiera de las cepas de Pseudomonas) una producción de CO<sub>2</sub> muy superior al control y a la de los nódulos de plantas tratadas con Bacillus. Por lo tanto debemos de suponer que no hay limitaciones energéticas para el normal funcionamiento de la nitrogenasa. Este hecho nos induce a pensar en el bloqueo de la actividad nitrogenásica por la presencia de inhibidores del crecimiento que actuen directamente o bien indirectamente, por ejemplo por un aumento de la entrada de oxígeno, demandado para la respiración, que afectase negativamente al enzima. En cuanto al bloqueo directo, cabe pensar en agentes quelantes de metales, especialmente hierro. El componente I de la nitrogenasa además de un átomo de molibdeno presenta entre 24 y 32 átomos de hierro. Así, una supresión exógena de la captación del metal puede reducir drásticamente el proceso fijador y por ello el contenido en nitrógeno de las plantas.

Podemos pensar que las plantas en estas condiciones (baja eficiencia fijadora por cualquiera de los motivos antes expuestos) recurra a la captación exógena de nitrógeno mineral, encadenándose con el problema añadido de la disminución de la superficie radical que se detecta en PN. Sin embargo hemos de destacar que no se aprecian signos tan claros de clorosis a pesar del bajo contenido de nitrógeno (en torno a 0.4 mg/g en PSN y sobre 0.6 mg/g en PN). Esto también se pone de manifiesto en que los parámetros biométricos son algo superiores en PN que en PSN.

Otros dos factores que pueden estar afectando al descenso del ARA en los nódulos de plantas tratadas con el medio de crecimiento de Pseudomonas son por una parte una baja eficiencia fotosintética que se refleje en la caída del ARA (Huss-Danell y Sellstedt, 1985). Por otra parte el crecimiento de Pseudomonas en el medio de cultivo y como efecto de su actividad mineralizadora puede liberar cantidades apreciables de amonio que como señalan Huss-Danell y Hahlin (1988), reduce el ARA en nódulos de Alnus incana.



El hecho de detectar bajos niveles de nitrógeno total tanto en PN como en PSN nos hace pensar que la fisiología de la planta en presencia de los medios de crecimiento de Pseudomonas se ve seriamente afectada, no solo en lo referente a la efectividad de la simbiosis (en PN) sino también en su capacidad para captar y translocar el nitrógeno presente en el Crone y esta debe de ser la razón por la cual todas las variables consideradas presentan diferencias mucho más acusadas cuando las plantas crecen en medio sin nitrógeno y dependen del fijado por Frankia. Por lo tanto podemos concluir que el efecto de las cepas de Pseudomonas ensayadas sobre lo alisos es de carácter general sobre el metabolismo energético, cobrando especial significado la hipótesis de un inhibidor general del metabolismo del tipo del HCN.

Los resultados del ensayo de Bacillus sobre PN son análogos a los detectados al ensayar las cepas de dicho género sobre PSN. Se observa una clara activación de todos los parámetros biométricos y químicos respecto al control, con escasa variación de una cepa a otra. Las causas de esta activación pueden ser las mismas que se barajaron al discutir los efectos inducidos en PSN: fitohormonas (probablemente auxinas), vitaminas o cualquier otro compuesto activador.

Al considerar los parámetros estudiados sólo en PN encontramos una clara activación del ARA que conduce a un aumento del contenido en nitrógeno de la planta y por ello un mayor desarrollo vegetativo. Quizá el aspecto más notable a resaltar de los resultados sea el efecto considerando conjuntamente ARA y producción de  $\text{CO}_2$ . Si comparamos los valores de ARA y respiración de los nódulos de plantas tratadas con medios de crecimiento de Pseudomonas y los tratados con Bacillus puede parecer que se da en este último una baja razón ARA/ $\text{CO}_2$  (sobre 1.2 etileno/ $\text{CO}_2$ ) respecto a los primeros (en torno a 4.9 etileno/ $\text{CO}_2$ ). Sin embargo al compararlos con el control se encontrará claramente que la relación ARA/ $\text{CO}_2$  que induce Bacillus está mucho más próxima a estos (sobre 1.9 etileno/ $\text{CO}_2$ ). Al comparar nuestros resultados con los de los controles de Vilkman *et al.* (1990) en su estudio del efecto de la oscuridad sobre el ARA y respiración nodular de Alnus incana, se encuentran relaciones ARA/ $\text{CO}_2$  proporcionales a las que detectamos en nuestros controles y en las plantas tratadas con Bacillus.

El conjunto de las consideraciones realizadas en la presente discusión pone de manifiesto, una vez más el intrincado conjunto de interacciones multidireccionales que se verifican en la rizosfera de las plantas y que afectan de un modo capital al crecimiento de estas y a la producción primaria de los sistemas naturales, agrícolas o silvícolas. En este sentido Steinberg (1947) ya detectó como, por ejemplo, muchas cepas de distintos géneros de rizobacterias no patogénicas (Pseudomonas, Serratia, Bacillus o Chromobacterium), producen en determinadas condiciones alteraciones fisiológicas. En el caso de las cepas de Pseudomonas estudiadas por nosotros, resulta claro que afectan negativamente a la fisiología de Alnus glutinosa, ya sea por la producción de sideróforos, HCN o cualquier otra fitotoxina. Es fácil suponer que en condiciones naturales estas cepas pueden estar reprimidas como patógenas por efecto de interacciones con otros microorganismos (que regulen su densidad) o por mecanismos desarrollados por las plantas a fin de controlar la patogeneidad potencial y "explotar" sus efectos beneficiosos. Podemos considerar también que los Bacillus promotores encontrados exhiban otros efectos en el medio rizosférico, estando modulada su actividad en el medio por los mismos factores que reseñábamos en el caso de Pseudomonas.

Sin embargo quedan evidenciadas las posibilidades que se abren en el futuro (probablemente no muy lejano) en lo que se refiere al empleo de cepas beneficiosas para la optimización de la producción vegetal. Antes de la extensión de estos métodos de gestión forestal o agrícola, que en la actualidad se están desarrollando, habrá que profundizar en mayor grado en los aspectos abordados en el presente trabajo.

## **8. CONCLUSIONES**

1. Se detecta una diferencia acusada, tanto cuantitativa como cualitativa en la composición de los exudados obtenidos en condiciones de cultivo hidropónico. La concentración de compuestos orgánicos nitrogenados y no nitrogenados (especialmente los primeros) es siempre mayor en plantas noduladas. No se detecta esta variación cuando los exudados se recogen en condiciones de estrés, únicamente se aprecia mayor concentración de lípidos en los exudados nodulares.

2. La actividad reductora de acetileno en los suelos ensayados se ve claramente activada por los exudados nodulares, radicales y de plantas noduladas, como consecuencia del aporte de materia orgánica que sirve de soporte energético al proceso. A partir de nuestros resultados no se puede descartar la incidencia del molibdeno liberado, activa o pasivamente por exudación, sobre los microorganismos fijadores libres de nitrógeno. La respuesta de estos microorganismos frente a los exudados de plantas sin nodular en cultivo hidropónico nos indica la existencia de otros factores además de los ya considerados, como inhibidores alelopáticos del proceso, que pueden tener una incidencia vital sobre el proceso de nodulación.

3. La inmovilización de nitrógeno detectada en los experimentos realizados con los exudados nodulares y radicales sobre la mineralización, demuestran la importancia de la composición de la materia orgánica sobre los procesos de inmovilización/mineralización, así como el papel del aliso como planta liberadora de compuestos orgánicos ricos en nitrógeno a través de las raíces.

4. Los exudados de Alnus glutinosa promueven un aumento de la nitrificación que resulta significativo en todos los casos menos con los exudados radicales. Nuestros resultados apoyan la hipótesis del efecto sinérgico positivo de la materia orgánica junto con el amonio sobre la nitrificación autótrofa. Por otra parte este proceso no ha resultado inhibido por la mayor riqueza en compuestos polifenólicos de los exudados nodulares y radicales, por lo que podemos concluir que este grupo de compuestos no parecen tener una incidencia decisiva sobre el proceso.

5. La producción de  $N_2O$  en presencia de exudados y en los controles está claramente activada por la presencia de materia orgánica oxidable. Este efecto se aprecia con los exudados procedentes de plantas crecidas en medios de cultivo hidropónico, tanto si están noduladas como si no. Esto demuestra que al menos en estas etapas del crecimiento no se desarrolla ninguna estrategia para la conservación del nitrógeno en el sustrato.

6. Las pruebas de producción de  $CO_2$  indican que, de un modo global, los exudados de Alnus glutinosa estimulan la actividad de la microflora edáfica heterótrofa, y por lo tanto la mineralización de la materia orgánica. No obstante la materia orgánica liberada por exudación muestra menor susceptibilidad a su degradación que los hidratos de carbono empleados en los controles, a pesar de la riqueza en nitrógeno de aquellos, lo que indica un elevado nivel de complejidad molecular.

7. La composición rizosférica bacteriana de Alnus glutinosa experimenta acusadas variaciones según la época de muestreo, perteneciendo mayoritariamente dichas bacterias a los géneros Bacillus y Pseudomonas. Ambos géneros manifiestan una variación estacional debida a las interacciones que se dan en la interfase raíz-suelo, a causa de las diferencias cualitativas y cuantitativas de la exudación y por efecto de la variación de los factores abióticos. Otros géneros bacterianos, menos frecuentes también exhiben una variación estacional de su frecuencia. De ellos Streptomyces es el único género que mantiene su frecuencia más estable a lo largo del año.

8. Pese a ser mayoritario Bacillus en los meses de otoño e invierno, podemos suponer que existe una variación entre estas dos estaciones en lo que a composición de especies y/o capacidades metabólicas, como se deduce de las considerables diferencias encontradas en la función de las bacterias estudiadas dentro del ciclo edáfico del nitrógeno.

9. Todas las bacterias presentan capacidad mineralizadora, pudiendo así utilizar los compuestos ricos en nitrógeno exudados por el aliso. El porcentaje de bacterias capaces de desnitrificar aumenta durante los meses de invierno, primavera y verano lo cual, junto con el aumento de bacterias capaces de fijar nitrógeno en condiciones aerobias, indica la coexistencia de microhábitats de características muy distintas.

10. Dada la escasa variabilidad genética, detectada a través del análisis de proteínas de reserva, de las semillas empleadas en los ensayos de germinación y crecimiento, podemos atribuir la variaciones detectadas en estos procesos exclusivamente al efecto de las cepas bacterianas ensayadas.

11. Algunas de las cepas bacterianas ensayadas sobre la germinación de Alnus glutinosa tienen una influencia decisiva sobre la capacidad y velocidad de germinación de las mismas.

12. Se detecta una abundancia relativa de bacterias activadoras de la germinación en las muestras de los meses precedentes a la época en que se produce la misma en el campo, así como una abundancia semejante de cepas activadoras e inhibidoras durante la primavera, lo que indica un equilibrio natural establecido de los agentes biológicos reguladores del proceso y un papel decisivo de los mismos en condiciones naturales.

13. El efecto inhibitorio de las cepas del género Pseudomonas se manifiesta de forma distinta según si las plantas de Alnus glutinosa presentan o no nódulos en sus raíces. En el caso de plantas no noduladas, desarrollan un aparato radical de considerable superficie en relación con su longitud y la situación se invierte si están noduladas. Este hecho puede tener especiales consecuencias en la normal nodulación de ejemplares adultos y por lo tanto en su capacidad para ocupar sustratos pobres en nitrógeno.

14. Las cepas inhibidoras del crecimiento y germinación de Alnus glutinosa no solo ocasionan una disminución de la biomasa aérea sino que además, la concentración de nitrógeno en los órganos de la planta es menor, dato que debemos asociar con un menor ARA y una mayor respiración nodular.

15. Las cepas activadoras del crecimiento y germinación de Alnus glutinosa promueven un aumento de su biomasa aérea y concentración de nitrógeno en los órganos de la planta, lo que indica una mejor captación del nitrógeno mineral en el caso de las plantas sin nodular (probablemente asociado al mayor desarrollo del aparato radical) y más eficacia en la fijación simbiótica del nitrógeno por parte de las plantas noduladas.

## 9. BIBLIOGRAFIA.

- ACERO, N, PROBANZA, A., BLANCO, B. y GUTIERREZ MANERO, F.J. 1994. Seasonal changes in physiological groups of bacteria that participate in nitrogen cycle in the rhizosphere of alder. Geomicrobiol. J., 12, (en prensa)
- AGER, A.A., HEILMAN, P.E., y STETTLER, R.F. 1993. Genetic variation in red alder (Alnus rubra) in relation to native climate and geography. Can. J. For. Res., 23, 1930-1939.
- ALEFF, K. y KLEINER, D. 1986. Arginine ammonification, a simple method to estimate microbial activity potentials in soils. Soil Biol. Biochem., 18, 233-235.
- ALEXANDER, M. 1961. Introduction to microbial ecology. Jhon Willey and Sons. Nueva York.
- ALEXANDER, M. 1980. Introducción a la microbiología del suelo. AGT Ed. S.A. Mexico.
- ALEXANDER, M. 1984. Ecology of Rhizobium. En: Biological nitrogen fixation, ecology, technology and physiology. M. Alexander (ed.). Plenum Press. New York. 39-50 pp.
- ALSTRÖM, S. 1987. Influence of root-zone inhabiting bacteria on growth of plants and soil-borne fungal pathogens. Tesis Doctoral. Swedish University of Agricultural Sciences. Upsala.
- ANDERSON, A. J., HABIBZADEGAH-TARI, P. y TEPPER, C. 1988. Molecular studies on the role of a root surface agglutinin in adherence and colonization by Pseudomonas putida. Appl. Environ. Microbiol., 54, 375-380.
- ARRESE-IGOR, C., ROYUELA, M., DE LORENZO, C., DE FELIPE, M.R. y APARICIO TEJERO, P.M. 1993. Effect of low rhizosphere oxygen on growth, nitrogen fixation and nodule morphology in lucerne. Physiol. Plant., 89, 55-63.
- ASANUMA, S., TANAKA, H. y YATAZAWA, M. 1979. Rhizoplane micro-organisms of rice seedlings as examined by scanning electron microscopy. Soil Science and Plant Nutrition, 25, 539-551.
- AYERS, W. A. y THORNTON, R. H. 1968. Exudation of aminoacids by intact and damaged roots of weat and peas. Plant and Soil, 28, 193-207.
- AZHAR, E. S., CLEEMPUT, O. V. y VERSTRAETE, W. 1986. Nitrification mediated nitrogen inmovilization in soils. Plant and Soil, 94, 401-409.
- BAILEY, L.D. y BEAUCHAMP, E.G. 1973. Effect of moisture, added  $\text{NO}_3^-$ -N, and macerated roots on  $\text{NO}_3^-$  transformations and redox potential in surface and subsurface soils. Can. J. Soil Sci., 53, 219-230.
- BAKKEN, L.R. 1990. Microbial growth and immobilization/mineralization of N in the rhizosphere. Symbiosis, 9, 37-41.
- BALDWIN, I.T., OLSON, R.K. y REINERS, W.A. 1983. Protein binding phenolics and the inhibition of nitrification in subalpine balsam fir soils. Soil Biol. Biochem., 15, 419-423.



BARAK, R., NUR, I. y OKON, Y. 1983. Detection of chemotaxis in Azospirillum brasiliense. Journal of Applied Bacteriology, 53, 399-403.

BARBARIKA, A. y SIKORA, L. J. 1985. Factors affecting the mineralization of nitrogen in sewage sludge applied to soils. Soil Sci. Soc. Am. J., 49, 1403-1406.

BARCLAY, G.A. y CROSSE, J.E. 1974. Populations of aerobic bacteria associated with the roots into soil. New Appl. Bacteriol., 37, 475-486.

BAZIN, M.J., MARKHAM, P., SCOTT, E.M. y LYNCH, J.M. 1990. Population dynamics and rhizosphere interactions. En: The rhizosphere. J.M. Lynch (ed.). John Wiley and sons. Chichester. 99-127 pp.

BECKER J. O., HEDGES, R.O. y MESSENS, E. 1985. Inhibitory effect of pseudobactin on the uptake of iron by higher plants. Appl. Environ. Microbiol., 49, 1090-1095.

BECKING, J. H. 1961. Studies on nitrogen-fixing bacteria of genus Beijerinckia. Plant and Soil, 14, 49-81.

BECKING, J. H. 1974. The family Frankiaceae. En: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. R.E. Bucham y N.E. Gibbons (eds.). The William and Wilkins Co. Baltimore. 701-706 pp.

BENNET, R.A. y LYNCH, J.M. 1981. Bacterial growth and development in the rhizosphere of gnotobiotic cereal plants. J. Gen. Microbiol., 125, 95-102.

BERGEY'S MANUAL OF SYTEMATIC BACTERIOLOGY. 1986. Williams and Wilkins (eds.). Londres.

BERMUDEZ DE CASTRO, F. 1981. Diazotrofia como técnica en agronomía y silvicultura. En: Productividad vegetal. C. Vicente (ed.). Ed. Univ. Complutense. Madrid. 191-225 pp.

BERMUDEZ DE CASTRO, F. 1976. Esudios sobre las simbiosis fijadoras de nitrógeno Alnus glutinosa (L.) Gaertn.-Frankia alni (Woronin) v. Tubeuf y Myrica gale L.-Frankia brunchorstii Möller. Tesis doctoral. Univ. de Salamanca. 310 pp.

BERMUDEZ DE CASTRO, F., BURGUETE, I. y SCHMITZ, M.F. 1984. Variaciones en la densidad de los microorganismos nitrificantes en alisedas. Studia Oecologica, 5, 85-89.

BERMUDEZ DE CASTRO, F. y GUTIEEREZ MAÑERO, F. J. 1987. Introduccion de Myrica gale en un pastizal. Respuesta de los grupos funcionales del ciclo del nitrógeno. Studia Oecologica, 6, 149-156.

BISHOP P.E., PREMAKUMAR, R., DEAN, D.R., JACOBSON M.R., CHISNELL, J.R., RIZZO, T.M. y KOPCSYNSKI, J. 1986. Nitrogen fixation by Azotobacter vinelandii strains having deletions in structural genes for nitrogenase. Science, 232, 92-94.

BLACKBURN, T.H. 1983. The microbial nitrogen cycle. En: Microbial Geochemistry. W.E. Krumbein (ed.). Blackwell Sci. Pub. Oxford. 63-89 pp.

- BLIGH, E.O. y DYER, W.J. 1959. A rapid method of total lipide extraction and purification. Can. J. Biochem. Physiol., 37, 911-920.
- BOHEM, M.J., MADDEN, L.V. y HOITINK, H.A.J. 1993. Effect of organic matter decomposition level on bacterial species diversity and composition relationship to Phytophthora damping-off severity. Appl. Environ. Microbiol., 12, 4171-4179.
- BOHTOOL, B.B., SCHMIDT, E.L. y BEASLY, C. 1977. Nitrification in the intertidal zone: influence of effluent type and effect of tannin on nitrifiers. Appl. Environ. Microbiol., 34, 523-528.
- BOLLEN, W.B. y LU, K.C. 1968. Nitrogen transformations in soils beneath red alder and conifers. En: Biology of alder. J.M. Trappe, J.F. Franklin, R.F. Tarrant y G.M. Hansen (eds.) U.S. Dep. Agric. For. Serv. Portland. Oregon. 141-148 pp.
- BOLTON, H., ELLIOT, L. F., GURUSIDDAIH, S. y FREDERICKSON, J. K. 1989. Characterization of a toxin produced by a rhizobacterial Pseudomonas sp. that inhibits wheat growth. Plant and Soil, 114, 269-278.
- BOND, G. 1951. The fixation of nitrogen associated with the root nodules of Myrica gale L. with special reference to its pH relation and ecological significance. Ann. Bot., 15, 447-449.
- BOWEN, G.D. 1969 Nutrients status effects on loss of amides and amino acids from pine roots. Plant and Soil, 30, 139-142.
- BOWEN, G.D. 1979. Integrated and experimental approaches to the study of growth of organisms around roots. En: Soil-borne plant pathogens. B. Schippers y W. Gams (eds.). Academic Press. Londres. 207-227 pp.
- BOWEN, G.D. 1981. The root-microorganisms ecoystems. En: Biological and chemical interactions in the rhizosphere. P. Brinck (ed.). Swedish Natural Science Research Council. Stockholm. 3-42 pp.
- BOWEN, G.D. y FOSTER, R.C. 1978. Dynamics of microbial colonization of plant roots. En: Proc. Symp. on soil microbiology and plant nutrition. W.J. Broughton y C.K. John (eds.). Univ. Malasia Press. 98-101 pp.
- BREMNER, J.M. y SHAW, K. 1958. Denitrification in soil II: Factors affecting denitrification. J. Agric. Sci., 51, 40-52.
- BROADBENT, F.E. y NAKASHIMA, T. 1967. Revision of fertilizer nitrogen in soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc., 31, 648-652.
- BROWN, M.E. 1972. Plant growth substances produced by microorganisms of soil and rhizosphere. J. Appl. Bact., 35, 443-451.
- BROWN, M.E. 1974. Seed and root bacterization. Annu Rev. Phytopathol., 12, 181-197.
- BROWN, M.E. 1975. Rhizosphere microorganisms-opportunists, bandits or benefactors. En: Soil microbiology. N. Walker (ed.). Butterworth. Londres. 21-38 pp.

BURNS, R. 1983. Extracellular enzyme-sustrate interactions in soil. En: Microbes in their natural enviroments. J.H. Salter, R. Whittenbury, y J.W.T. Wimpenny (eds.). Symp Soc. Gen. Microbio., 34, Cambridge Univ. Press. Cambridge. 249-298 pp.

BURR, T.J. y CAESAR, A. 1984. Beneficial plant bacteria. Critical Rev. Plant. Sci., 2, 1-20.

BUSTROM, H.G. 1965. The physiology of plant roots. En: Ecology of soil-borne pathogens. K.F. Baker, W.C. Snyder (eds.). Univ. Calif Press. Berkley. 154-169 pp.

CADY, F. B. y BARTHOLOMEW, W. V. 1960. Sequential products of anaerobic denitrification in Norfolk soil. Soil Sci. Soc. Am. Proc., 24, 477-482.

CAMPBELL, R. 1985. Microbiology of roots. En: Plant microbiology. R. Cambell (eds.). Edward Arnold Ltd. Londres. 106-152 pp.

CERNA, S. 1967. Localization of some biochemical processes in structural soil. Acta Univ. Carolinae-Biologica, 91-94 pp.

CHAE, Y.M. y TABATABAI, M.A. 1986. Mineralization of nitrogen in soils ammended with organic wastes. J. Environ. Qual., 15, 193-198.

CHADWICK, A.V. y BURG, S.P. 1987. An explanation of the inhibition of growth caused by indole-3-acetic acid. Plant. Physiol., 42, 415-420.

CHAN, E.C.S., KATZNELSON, H. y ROUATT, J.W. 1963. The influence of soil and root extraction the associative growth of selected soil bacteria. Con. J. Microbiol., 9, 187-197.

CHEN, T.-S., HUANG, T.-C. y CHOW, T.-J. 1988. Calcium requeriment in nitrogen fixation in the cyanobacterium Synechococcus RF-1. Planta, 173, 253-256.

CHILD, J.J. 1981. Biological nitrogen fixation. En: Soil biochemistry. E.A. Paul y J.N. Ladd (eds.). Marcel Dekker, Inc., Nueva York. 297-322 pp.

CHOUDHURY, M. S. y CORNFIELD, A. H. 1978. Nitrogen and carbon mineralization during incubation of two Bangladesh soils in relation to temperature. Plant and Soil, 49, 317-321.

CLARCK, F.E. 1981. the nitrogen cycle, viwed with poetic licence. En: Terrestrial Nitrogen Cycles. F.E.Clarck, T. Roswall (eds.). Ecol. Bull. (Estocolmo), 33, 210-213.

CLARK, J.M 1983. Experimental Biochemistry. Freeman & Co. (Eds.). San Francisco. 229 pp.

CLARHOLM, M. 1985. Interactions of bacteria, protozoa, and plants leading to mineralization of soil nitrogen. Soil Biol. Biochem., 17, 181-187.

CLAUS, D. 1981. The genus Sporosarcina. En: The Prokaryotes. A handbook on habits, isolation, and identification of bacteria. Starr, Stolp, Trüper, Balows y Schlegel (eds.). Springer-Verlag. Berlin. 1804-1807 pp.

- COLEMAN, D.C., REID, C.P.P. y COLE, C.V. 1983. Biological strategies of nutrient cycling in soil systems. Advances in Ecological Research., 13, 1-57.
- COLEY-SMITH, J.R. y KING, J.E. 1970. Response of resting structures of root-infecting fungi to host exudates: An example of specificity. En: Root diseases and soil-borne pathogens. T.A. Tousson, R.V. Bega y P.E. Nelson (eds.). Univ. Calif. Press. Berkeley. 130-133 pp.
- COOK, R.J. y BAKER, K.F. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. American Phitopathological Society. St. Paul. 539 pp.
- COOKSEY, D.A. y MOORE, L.W. 1980. Biological control of crown galled with fungal and bacteria antagonist. Phytopathology, 70, 506-509.
- COWLING, E.B. y MERRIL, W. 1966. Nitrogen in wood and its role in wood deterioration. Can. J. Bot., 44, 1539-1554.
- CRESCENZI, F., BITTONI, A. y FATUMA, L. 1988. Hindered nitrification potential in a loamy soil amended with glucose. Soil Sci. Plant Anal., 19, 1655-1665.
- CURL, E.A. y TRUELOVE B. 1986. The rizosphere. Advances series in agricultural sciences, 15. D.F.R. Bommer, B.R. Sabey, Y. Vaadia, G.W. Thomas y L.D. Van Vleck (eds.). Spriger-Verlag. Berlin. 280 pp.
- DAHM, H. 1984a. Genetic composition and physiological and cultural properties of heterotrophic bacteria isolated from soil. Rhizosphere and mycorrhizosphere of pine (Pinus sylvestris). Acta Microbiol. Pol., 33, 147-156.
- DAHM, H. 1984b. Metabolic activity of bacteria isolated from soil, rhizosphere and mycorrhizosphere of pine (Pinus sylvestris L.). Acta Microbiol. Pol., 33, 157-162.
- DANSO, S.K.A., BOWEN, G.D. y SANGINGA, N. 1992. Biological nitrogen fixation in trees agro-ecosystems. Plant and Soil, 141, 177-196.
- D'ARCY LAMETA, A. y JAY, M. 1987. Study of soybean and lentil root exudates. Plan and Soil, 101, 267-272.
- DANIERE, S., CAPELLANO, A. y MOIROUD, A. 1986. Dynamique de l'azote dans un peuplement naturel d'Alnus incana (L.) Moench. Oecol. Plant., 7, 165-175.
- DAVISON, J. 1988. Plant beneficial bacteria. Biotechnology, 6, 282-286.
- DE CANTAZARO, J.B., BEAUCHAMP, E.G. y DRURY, C.F. 1987. Denitrification vs dissimilatory nitrate reduction in soil with alfalfa, straw, glucose and sulfide treatments. Soil Biol. Biochem., 19, 583-587.
- DE DATTA, S. K. 1987. Nitrogen transformations processes in relation to improved cultural practices for lowland rice. Plant and Soil, 100, 47-69.
- DE FREITAS, J.R., GUPTA, V.V.S.R. y GERMIDA, J.J. 1993. Influence of Pseudomonas syringae R25 and P. putida R105 on growth and N<sub>2</sub> fixation (acetilene reduction activity) of pea (Pisum sativum L.) and field bean (Phaseolus vulgaris L.). Biol. Fert. Soils, 16, 215-220.

- DELPHIN, J. E. 1986. Evaluation du pouvoir minéralisateur de sols agricoles en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques. Agronomie, 6, 453-458.
- DERYLO, M. y SKORPUSKA, A. 1993. Enhancement of symbiotic nitrogen fixation by vitamin-secreting fluorescent Pseudomonas. Plant and Soil, 154, 211-217.
- DÖBEREINER, J. y CAMPELO, A. B. 1971. Non-Symbiotic nitrogen-fixing bacteria in tropical soils. Plant and Soil, Special Vol., 457-470.
- DOMMERGUES, Y.R. y KRUPA, S.V. (eds.). 1978. Interactions between non-pathogenic soil microorganisms and plants. Elsevier. Amsterdam. 475 pp.
- DORLAND, S. y BEAUCHAMP, E.G. 1991. Denitrification and ammonification at low soil temperatures. Can. J. Soil. Sci., 71, 293-303.
- DOXTADER, K.G. y ALEXANDER, M. 1966. Nitrification by heterotrophic soil microorganisms. Soil Sci. Soc. Am. Proc., 30, 351-355.
- DOYLE, A.D., MOORE, K.J. y HERRIDGE, D.F. 1988. The narrow-leaved lupin (Lupinus angustifolius L.) as a nitrogen-fixing rotation crop for cereal production. III. residual effects of lupins on subsequent cereal crops. Aust. J. Agric. Res., 39, 1029-1037.
- DROZD, J. y POSTGATE, J. R. 1980. Effects of oxygen on acetylene reduction, cytochrome content and respiratory activity of Azotobacter chroococcum. J. Gen. Microbiol., 63, 63-73.
- DULLAART, J. 1970. The auxin content of root nodules and roots of Alnus glutinosa (L.) Gaertn. J. Exp. Bot., 21, 975-984.
- EBEL, J. 1986. Phytoalexin synthesis: the biochemical analysis of the induction process. Annu. Rev. Phytopathol., 24, 235-264.
- EKPETE, D.M. y CORNFIELD, A. H. 1965. Effect of pH and addition of organic materials on denitrification losses from soil. Nature, 208, 1200 pp.
- ELLIOT, L.F., GILMOUR, C.M., COCHRAN, V.L., COLEY, C. y BENNET, D. 1979. Influence of tillage and residues on wheat root microflora and root colonization by nitrogen-fixing bacteria. En: The soil-root interface. J.G. Harley y R.S. Russell (eds.) Academic Press New York. 243-258 pp.
- FENWICK, L. 1973. Studies on rhizosphere microflora of onion plants in relation to temperature changes. Soil Biol. Biochem., 5, 315-320.
- FOCHT, D. D. 1974. The effect of temperature, pH, and aeration on the production of nitrous oxide and gaseous nitrogen, a zero kinetic model. Soil Sci., 118, 173-179.
- FOCHT, D.D. y VERSTRAETE, W. 1977. Biochemical ecology of nitrification and denitrification. Ann. Rev. Microbiol. Ecol., 1, 135-214.
- FOSTER, R.C. y ROVIRA, A.D. 1978. The ultrastructure of rhizosphere of Trifolium subterraneum L. Microbial ecology. Loutet y J.A.R. Miles (eds.). Springer-Verlag. Berlin. 278-290 pp.

- FOSTER, R. C. 1986. The ultrastructure of the rizoplane and rhizosphere. Annu. Rev. Phytopath., 23, 173-199.
- FRANKLING, J. F. y WARING, R. H. 1980. Distinctive features of the northwestern coniferous forests: development, structure and function. En: Forests: fresh prespectives from ecosystem analysis. R. H. Waring (ed.). Oregon St. Univ. press. Corvallis. 59-85 pp.
- FREENCH, R. C. 1985. The bioregulating action of flavour compounds on fungal spores and other properties. Annu. Rev. Phytopatol., 21, 162-185.
- FREDERICK, L.R. 1957. Formation of nitrate from ammonium nitrogen in soils: 2. Effect of population of nitrifiers. Soil Sci., 83, 481-485.
- FRENY, J.R., SIMPSON, J.R. y DENMEAD, O.T. 1981. Ammonia volatilization. Ecol. Bull. (Estocolmo), 33, 291-302.
- FRESQUEZ, P.R. y LINDEMANN, W.E. 1982. Soil and rhizosphere microorganisms in amended coal mine spoils. Soil Sci. Soc. Am. J., 46, 751-755.
- FUENTES-RAMIREZ, L.E., JIMENEZ-SALGADO, T., ABARCA-OCAMPO, I.R. y CABALLERO-MELLADO, J. 1993. Acetobacter diazotrophicus, an indoleacetic acid producing bacterium isolated from sugarcane cultivars of Mexico. Plant and soil, 154, 145-150.
- GAMBLE, R. N., BETLACH, M.R. y TIEDJE, J.M. 1977. Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils. Appl. Environ. Microbiol., 926-939.
- GARCIA, J.L. 1977. Analyse de différences groupes composant la microflor dènitricante de sols de rizières du Sénégal. Ann. Microbiol. (Inst. Pasteur.), 128, 433-446.
- GARCIA TREJO, A. 1981. Experimentos en microbiología del suelo. Cia. Ed. Continental S.A. Mexico D.F. 75 pp.
- GARRET, S.D. 1963. Soil fungi and soil fertility. En: Experimental microbial ecology. R.G. Burns y J.H. Slater (eds.). Londres. 164-177 pp.
- GASKINS, M.H., ALBRECHT, S.L. y HUBBELL, D.H. 1985. Rhizosphere bacteria and their use to increase plant productivity: A review. Agric. Ecosyst. Environ., 12,
- GAUR, A.C., SADASIVAM, K.V. VINAL, O.P. y ATHUR, R.S. 1971. A study on the decomposition of organic matter in alluvial soil: CO<sub>2</sub> evolution, microbiological and chemical transformations. Plant and Soil, 34, 17-28.
- GEELS, F.P. y SCHIPPERS, B. 1983. Selection of antagonistic fluorescent Pseudomonas spp and their root colonization and persistence following treatment of seed potatoes. Phytopath. Z., 108, 193-206.
- GEELS, F.P, LAMBERS, J.G., HOEKSTRA, O. y SCHIPPERS, B. 1986. Potato yield response to seed tuber bacterization in the field in various rotations. Neth. J. Pl. Path., 92, 257-272.

GEORGE, U. S. y ANTOINE, A. D. 1982. Denitrification potential of a salt marsh soil: effect of temperature, pH, and substrate concentration. Soil Biol. Biochem., 14, 117-125.

GIBSON, A. H. y JORDAN, D. C. 1983. Ecophysiology of nitrogen-fixing systems. En: Encyclopedia of plant physiology. Lange, O., Novel, P., Osmond, C. B. y Ziegler, H. (eds.). Berlin. 302-390 pp.

GILL, P. R. y WARREN, G. J. 1988. An iron-antagonized fungistatic agent that is not required for iron assimilation from a fluorescent rhizosphere pseudomonad. J. Bacteriol., 170, 163-170.

GILLAM, J. W., DASBERG, S., LUND, L. J. y FOCT, D. D. 1978. Denitrification in four California soils: effect of soil profile characteristics. Soil Sci. Soc. Am. J., 42, 61-66.

GÖKÇEOĞLU, M. 1988. Nitrogen mineralization in volcanic soil under grassland, shrub and forest vegetation in the Aegean region of Turkey. Oecologia, 77, 242-249.

GOMEZ, M. A. y SARGADOY, M. A. 1985. Efecto del glifosato sobre bacterias aerobias que colonizan un suelo arenoso. An. Edafol. Agrobiol., 44, 119.

GOSZ, J. R. 1981. Nitrogen cycling in coniferous ecosystems. Ecol. Bull. (Stockholm), 33, 405-426.

GRANHALL, U. 1981. Biological nitrogen fixation in relation to environmental factors and functioning of natural ecosystems. Ecol. Bull. (Stockholm), 33, 131-145.

GRANT, D. y BINKLEY, D. 1987. Rates of free-living nitrogen fixation in some piedmont forest types. Forest Sci., 33, 548-551.

GRIFFIN, D. M. 1972. Ecology of soil fungi. Chapman and Hall. Londres. 193 pp.

GRIFFITHS, B. y ROBINSON, D. 1992. Root-induced nitrogen mineralisation: a nitrogen balance model. Plant and Soil, 139, 253-263.

GROMALE, A. G., BARADWILL, C. J. y DAVIS, M. M. 1949. Concentration measurement. Biuret method for proteins. En: Hawk's physiological Chemistry. McGraw-Hill (Ed.). Nueva York. 757 pp.

GUTIERREZ MAÑERO, F. J. 1987. Estudios sobre la influencia de Myrica gale en la microflora edáfica del ciclo del nitrógeno. Tesis Doctoral. Univ. Complutense. Madrid. 339 pp.

HADAS, A., FEIGIN, A., FEIGENBAUM, S. y PORTNOY, R. 1989. Nitrogen mineralization in the field at various soil depths. J. Soil Sci., 40, 131-137.

HAHN, D., STARRENBURG, M. J. C. y AKKERMANS, A. D. L. 1988. Variable compatibility of cloned Alnus glutinosa ecotypes against infective Frankia strains. Plant and Soil, 107, 233-243.

- HAIDER, K. 1986. Changes in substrate composition during the incubation of plant residues in soil. En: Microbial Communities in soil. V V. Jensen, A: Kjoller y L.H. Sorensen (eds.). Elsevier Appl. Sci. Pub. Ltd. Londres. 133-147.
- HALE, M.G., MOORE, L.D. y GRIFFIN, G.J. 1978. Root exudates and exudation. En: Interactions between non-pathogenic soil microorganisms and plants. Y. R. Dommergues y S.V. Krupa (eds.). Elsevier Scientific Pub. Co. Amsterdam. 163-203 pp.
- HALE, M.G., MOORE, L.D. y GRIFFIN, G.J. 1981. Factors affecting root exudation and significance for rhizosphere ecosystems. En: Biological and chemical interactions in the rhizosphere. Symp. Proc. Ecol. Res. Comm. Swed. Nat. Sci. Res. Counc. Estocolmo. 43-71 pp.
- HAMLEN, R.A., LUKECIK, F.L. y BLOOM, J.R. 1972. Influence of age and stage of development on the neutral carbohydrate components in root exudates from alfalfa plants grown in a gnotobiotic environment. Can. J. Plant. Sci., 52, 633-642.
- HARARI, A., KIGEL, J. y OKON, Y. 1989. Involvement of IAA in the interaction between Azospirillum brasilense and Panicum miliaceum roots. En: Nitrogen fixation with non-legumes. F. Skinner, R.M. Boddey, I. Fendrik (eds.). Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 227-234 pp.
- HARDY, R. W. F., BURNS, C. R. y HOLSTEN R. D. 1973. Applications of the acetylene-ethylene assay for measurement of nitrogen fixation. Soil Biol. Biochem., 5, 47-81.
- HARDY, R.W.F. y HOLSTEN, R.D. 1972. Global nitrogen cycling: pools, evolution, transformations, transfers, quantitation, and research needs. En: The aquatic environment: microbial and water management implications. L.J. Guarraia y R.K. Ballentine (eds.). U. S. Government Printing Office, Washington D.C. 87-132 pp.
- HARMAN, J.H. 1967. Modern factor analysis. 2nd ed. Univ. Chicago Press. Chicago. 133 pp.
- HENDRICKSON, O.Q., BURGESS, D., PERINET, P., TREMBLAY, F. y CHATATPAUL, L. 1993. Effects of Frankia on field performance of Alnus clones and seedlings. Plant and Soil, 150, 295-302.
- HERRIDGE, D.F. 1988. The narrow-leaved lupin (Lupinus angustifolius L.) as a nitrogen-fixing rotation crop for cereal production. I. Indices of nitrogen fixation. Aust. J. Agric. Res., 39, 1015-1017.
- HILTNER, L. 1904. Über neuere Erfahrungen und Probleme auf dem Gebiet der Bodenbakteriologie und unter besonderer Berücksichtigung der Grundung und Brache. Arb. Dsch. Landwirt. Ges., 98, 59-78.
- HOWELL, C.R. y STIPANOVIC, R.D. 1979. Control of Rhizoctonia solani on cotton seedlings with Pseudomonas fluorescens with an antibiotic produced by the bacterium. Phytopathol., 69, 480-482.
- HSIAO, T. C. 1973. Plant responses to water stress. Ann. Rev. Plant. Physiol., 24, 519-570.



HSIEH, Y. P. 1988. Dynamics of carbon, nitrogen and phosphorus cycling in a sawgrass tidal marsh with special reference to the aboveground primary production. J. Environ. Qual., 17, 676-681.

HUSS-DANEL, K. y HAHKIN, A.-S. 1988. Nitrogenase activity decay and energy supply in Frankia after addition of ammonium to host plants Alnus incana. Physiol. Plant., 74, 745-751.

HUSS-DANEL, K. y SELLSTEDT, A. 1985. Nitrogenase activity in response to darkening and defoliation of Alnus incana. J. Exp. Bot., 36, 1352-1358.

HUNT, H.W., INGHAM, E.R., COLEMAN, D.C. y REID, C.P.P. 1988. Nitrogen limitation of production and decomposition in prairie, mountain meadow and pine forest. Ecology, 69, 1009-1016.

HUTCHINSON, G.E. 1950. Survey of contemporary knowledge of biogeochemistry. III. Bull. Amer. Mus. Nat. Hist., 96, 3-26.

INGRAHAM, J.L. 1981. Microbiology and genetics of denitrifiers. En: Denitrification nitrification and atmospheric nitrous oxide. C. C. Delwiche (ed.). John Wiley and Sons. Nueva York. 45-84 pp.

INGRAHAM, R.E., TORFYMOW, J.A., INGHAM, E.R. y COLEMAN, D.C. 1985. Interactions of bacteria, fungi and their nematode grazers: effects on nutrient cycling and plant growth. Ecological Monographs, 55, 119-140.

JOHNSON, D.W. y COLE, D.W. 1980. Anion mobility in soils: relevance to nutrient transport from terrestrial ecosystems. Environ. Internat., 3, 79-90.

JOHNSON, L.F. y CURL, E.A. 1972. Methods for research on the ecology of soil-borne plant pathogens. Burgess. Minneapolis. Minn.

JONES, F.G.W. 1959. Ecological relationships of nematodes. En: Plant pathology, problems and progress. C.S. Holton, G.W. Fisher, R.W. Fulton, H. Hart y S.E.A. McCallan (eds.). Univ. Wisc. Press, Madison, Wisc. 395-411 pp.

JONES, R. W. y HEDLIN, R. A. 1970. Ammonium, nitrite and nitrate accumulation in three Manitoba soils as influenced by added ammonium sulfate and urea. Can. J. Soil Sci., 50, 331-338.

JUO, P. y STOTZKY, G. 1971. Electrophoretic separation of proteins from roots and root exudates. Can. J. Bot., 48, 713-718.

KADO, C.I. y HESKETT, M.G. 1970. Selective media for isolation of Agrobacterium, Cornebacterium, Erwinia, Pseudomonas and Xantomonas. Phytopathology, 60, 969-976.

KATYAL, J. C., CARTER, M. F. y VLEK, P. L. G. 1988. Nitrification activity in submerged soils and its relation to denitrification loss. Biol. Fertil. Soils, 7, 16-22.

KATZNELSON, H. 1965. Nature and importance of the rhizosphere. En: Ecology of soil borne plant pathogens. Prelude to biological control. K.F. Baker y W.C. Snyder (eds.). University of California Press. Berkeley. 187-209 pp.

KAY, I. S. y VIRGINIA, R. A. 1989. Asymbiotic dinitrogen fixation by tundra in Imnavit Creek drainage, Alaska, USA. Biol. Fertil. Soils, 7, 207-212.

KEENEY, D. R. 1980. Prediction of soil nitrogen availability in forest ecosystems: a literature review. Forest Sci., 26, 159-171.

KELLY, D.P. 1978. Bioenergetics of chemolithotrophic bacteria. En: Companion to microbiology. A.T. Bull y P.M. Meadow (eds.). Longman. Londres. 363-386 pp.

KIEFT, T.L., SOROKER, E., FIRESTONE, M.K. 1987. Microbial biomass response to a rapid increase in water potential when dry soil is rewetted. Soil Biol. Biochem., 19, 119-126.

KIMOW, A. y DEBRON, J.J. 1989. Hydrogen metabolism and nitrogen fixation of soybean (Glycine max L.) inoculated with different strains of Rhizobium spp. Biol. Fertil. Soils, 7, 259-262.

KJELDAHL, J. 1883. A new method for the determination of nitrogen organic matter. Z. Anal. Chem., 22, 366.

KLEIN, D. A., FREDERICK, B. A. y REDENTRE. 1989. Fertilizer effects on soil microbial communities and organic matter in the rizosphere of Sitanion histrix and Agropyron smithii. Arid. Soil Res. Rehab., 3, 397-404.

KLEMEDTSSON, L., SVENSSON, R. H. y ROSSWALL, T. A. 1986. Method to selective inhibition to distinguish beetwen the N<sub>2</sub>O contributions of nitrification and denitrification in soil. Pub. Dept. Microbiol. Univ. Uppsala. 178 pp.

KLOEPPER, J.W. 1979. The role of rhizobacteria in increasing plant growth and yield. Tesis Doctoral. Universidad de Berkeley. California.

KLOEPPER, J.W. 1983. Effect of seed piece inoculation with plant growth-promoting rhizobacteria on populations of Erwinia carotobora on potato roots in daughters tubers. Phytopathology, 73, 217-219.

KLOEPPER, J.W., SCHROTH, M.N. y MILLER, T.D. 1980. Effects of rhizosphere colonization by plant growth-promoting rhizobacteria on potato plant development and yield. Phytopoatology, 70, 1078-1082.

KROTZKY, A., BERGGOLD, R., JAEGER, D., DART, P.J. y WERNER, D. 1983. Enhacement of aerobic nitrogenase activity (acetylene reduction assay) by phenol in soils and the rhizosphere of cereals. Zeit. Pflanzenern. Boden., 146, 634-642.

KROTZKY, A., BERGGOLD, R. y WERNER, D. 1986. Analysis of factors limiting associative N<sub>2</sub>-Fixation (C<sub>2</sub>H<sub>2</sub> reduction) with two cultivars of Sorghum mutans. Soil Biol. Biochem., 18, 201-207.

KRUPA, S. y NYLUND, J. 1972. Studies on ectomycorrhizae of pine. III, Growth inhibition of two root pathogenic fungi by volatile organic constituents of ectomycorrhizal root systems of Pinus silvestris L. Eur. J. For. Pathol., 2, 88-94.

LAMANCEAU, P. y ALABOUVETE, C. 1993. Suppression of Fusarium with a fluorescent pseudomonads: mechanisms and applications. Biocont. Sci. Technol., 3, 219-234.

LAMBERS, H. 1985. Respiration in intact plant and tissues: its regulation and dependence on environmental factors, metabolism respiration and invaded organisms. Encyclopedia Pl. Physiol., 18, 418-465.

LATEY, J., VALORAS, N. HADAS, A. y FOCHT, D.D. 1980. Effect of air filled porosity, nitrate concentration and time on the ratio  $N_2O/N_2$  evolution during denitrification. J. Environ. Qual., 9, 227-231.

LEPPARD, G.G. 1974. Rhizoplane fibrils in wheat. Demonstration and derivation. Science, 185, 1066-1068.

LIBBERT, E. y RICH, H. 1969. Interactions between plants and epiphytic bacteria regarding their auxin metabolism. V. Isolation and identification of the IAA-producing and destroying bacteria from pea plants. Physiol. Plant., 22, 51-58.

LIEVENS, K.H., VAN RIJSBERGEN, R., LEYNS, F.R., LAMBERT, B.J., TENNING, P., SWINGS, J. y JOOS, H.J.P. 1989. Dominant rhizosphere bacteria as a source of antifungal agents. Pestic. Sci., 27, 141-154.

LIN, L.P. y SADOFF, H.L. 1969. Chemical composition of Azotobacter vinelandii cysts. J. Bacteriol., 100, 480-486.

LINE, M.A. y LOUIT, M.W. 1971. Non-symbiotic nitrogen-fixing organisms from some New Zealand tussock-grassland soils. J. Gen. Microbiol., 66, 309-318.

LIKENS, G.E., BORMANN, F.H. y JOHNSON, N.M. 1969. Nitrification: importance to nutrient losses from a cutover forested ecosystem. Science, 163, 1205-1206.

LLINARES, F. 1990. Densidad y actividad de los microorganismos del ciclo del nitrógeno bajo el dosel de Elaeagnus angustifolia L. Memoria de Licenciatura. Univ. Comp. Madrid. 137 pp.

LLINARES, F. 1993. Regulación del ciclo del nitrógeno a nivel edáfico por Elaeagnus angustifolia L. y Alnus glutinosa (L.) Gaertn. Tesis Doctoral. Univ. Complutense de Madrid. 251 pp.

LOCHEAD, A.G. 1959. Rhizosphere microorganisms in relation to root-disease fungi. En: Plant pathology problems and progress. C.S. Holton, G.W. Fischer, R.W. Fulton, H. Hart y S.E.A. McCallan (eds.). Univ: Wisc. Press, Madison, Wisc. 327-338 pp.

LONEGAN, J.F. 1975. The availability and absorption of trace elements in soil-plant systems and their relation to the movement and concentration of trace elements in plants. En: Trace elements in Soil-Plant-Animal systems. D.J.D. Nicholas y A.R. Egan (eds.). Academic Press Inc. Nueva York. 109-134 pp.

LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L y RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Biochem., 193, 265-269.

- LOZANO, J. M. y VELASCO, F. 1972. Alteraciones sinecológicas de la población microbiana en un antiguo bosque de Quercus toza Bosch. repoblado con Pinus pinaster Sol. An. Edafol. Agrobiol., 31, 615-624.
- LOZANO, J. M. y VELASCO, F. 1981. Evolución del humus y de la microflora telúrica por la implantación de Eucalyptus camaldulensis Dehn. en bosques autóctonos de Extremadura. An. Edafol. Agrobiol., 40, 711-718.
- LUND, V., GOKSOYR, J. 1980. Effects of water fluctuations on microbial mass and activity in soil. Microbial Ecol., 6, 115-123.
- LYNCH, J. M. 1981. Promotion and inhibition of soil aggregate stabilization by soil microorganisms. J. Gen. Microbiol., 126, 371-375.
- LYNCH J.M. 1983. Soil biotechnology. Microbiological factors in crop productivity. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 191 pp.
- LYNCH, J.M. 1987a. Promotion and interactions in the rhizosphere. AFRC Institute of Horticultural Research, Soil microorganisms, Pub. no. 30. Soil Microbial Society of Japan. 33-41 pp.
- LYNCH, J. M. 1987b. Microbial interactions in the rhizosphere. AFRC Institute of Horticultural Research, Soil microorganisms, Pub. no. 30. Soil Microbial Society of Japan, 42-73.
- LYNCH, J.M. 1990. The rhizosphere. J.M. Lynch (ed.). John Wiley and sons. Chichester. 458 pp.
- LYNCH, J.M. Y BRAGG, E. 1985. Micro-organisms and soil aggregate stability. Adv. Soil Sci., 2, 133-171.
- MANDELOFF, D.J. 1987. Dynamics of nitrogen mineralization and nitrification in hemlock and hardwood treefall gaps. Ecology, 68, 1171-1181.
- MANSFRED, J. W. y BROWN, I. R. 1981. The biology of interactions between plants and bacteria. En: Biology and Molecular Biology of plant-pathogen interactions. J. A. Bailey (ed.). NATO ASI Series, Series H Cell Biology. 71-98.
- MARTIN, J.K. 1977 a. Factors influencing the loss of organic carbon from roots. Soil Biol. Biochem., 9, 1-6.
- MARTIN, J. K. 1977 b. Effect of soil moisture on the release of organic carbon from wheat roots. Soil Biol. Biochem., 9, 303-304.
- MATHES, K. y SCHRIEFER, T. 1985. Soil respiration during secondary succession: Influence of temperature and moisture. Soil Biol. Biochem., 17, 205-211.
- McCARTY, G.W. y BREMNER, J.M. 1986. Effect of phenolic compounds on nitrification in soil. Soil. Sci. Soc. Am. J., 50, 1423-1429.
- McNABB, D. y GEIST, M. 1979. Acetylene reduction assay of symbiotic nitrogen fixation under field conditions. Ecology. 1070-1072.

- MIKKELSEN, D.S. 1987. Nitrogen budgets in flooded soils used for rice production. Plant and Soil, 100, 71-97.
- MISHUSTIN, E.N. y NAUMOUA, A.N. 1962. Bacterial fertilizers, their effectiveness and mode of action. Mikrobiologiya, 31, 543-555.
- MILHAM, P. J., AWAD, A. S., PAULL, R. E. y BULL, J. E. 1970. Analysis of plant, soils and waters for nitrate by using an ion-selective electrode. Analyst., 95, 751-757.
- MILLER, R.D. y JHONSON, D.D. 1964. The effect of soil moisture tension on carbon dioxide evolution, nitrification and nitrogen mineralization. Soil Sci. Soc. Am. Proc., 28, 644-647.
- MILLER, R.E, REUKEMA, D.L. y MAX, T.A. 1993. Size of Douglas-fir trees in relation to distance from a mixed red alder-douglas fir stand. Can. J. For. Res., 23, 2413-2418.
- MOLINA, J.A. y ROVIRA, A.D. 1963. the influence of plant roots on autotrophic nitrifying bacteria. Can. J. Bot., 10, 249-257.
- MONROE, C.D. y KLADIVKO, E.J. 1987. Aggrete stability of a silt loam soil as affected by roots of corn, soybeans and wheat. Commun. Soil Sci. Plant Anal., 18, 1077-1087.
- MONTAGNINI, F. y BUSCHBACHER, R. 1989. Nitrification rates in two undisturbed tropical rain-forests and three slash-and-burn sites of the Venezuelan Amazon. Biotropica, 21, 9-14.
- MONTOYA, M. 1992. Papel de la constitución protéica de la semilla en el desarrollo temprano de Vicia villosa Roth. Tesina de licenciatura. Univ. Complutense. Madrid. 67 pp.
- MOOREHEAD, K. K., GRAETZ, D. A. y REDDY, K. R. 1988. Mineralization of carbon and nitrogen from freeze- and over-dried plant material added to soil. Soil Sci. Soc. Am. J., 52, 1343-1346.
- MUKHERJEE, S. P. y CHOUDHURI, M. A. 1981. Effect of water stress on some oxidative enzymes and senescence in Viginia seedlings. Physiologia Plantarum, 52, 37-42.
- MULLER, M. M., SUNDMAN, V. y SKUJINS, J. 1980. Denitrification in low pH spodosols and peats determined with the acetylene inhibition method. Appl. Environ. Microbiol., 40, 235-239.
- NAKAS, J.P. y KLEIN, D.A. 1980. Mineralization capacity of bacteria and fungi from the rhizosphere-rhizoplane of a semiarid grassland. Appl. Environ. Microbiol., 39, 113-117.
- NEAL, J.L., LU, K.C., BOLLEN, W.B. y TRAPPE, J.M. 1968. A comparison of rhizosphere microflora associated with mycorrhizae of Red Alder and Douglas-fir. Biology of Alder. Proceedings of Symposium Northwest Scientific Association. XL Reunión anual. Portland, Oregon. USA. 179-184 pp.

- NEILANDS, J.B. 1977. Siderophores: Biochemical ecology and mechanisms of iron transport in enterobacteria. En: Bioinorganic Chemistry. K.N. Raymond (ed.). Adv. Chem. Ser. 162, Am. Chem. Soc. Washington DC. 3-32 pp.
- NELSON, L. M. y EDIC, S. A. 1988. Effect of nitrate on nitrogen fixation and nodule carbohydrate and organic acid concentrations in pea mutants deficient in nitrate reductase. Physiol. Plant., 73, 534-540.
- NEYRA, C.A. y DOBEREINER, J. 1983. Nitrogen fixation in grasses. Advan. Agron., 29, 1-38.
- NIETO, K.F. y FRANKENBERGER, W.T. 1989. Biosynthesis of cytokinins by Azotobacter chroococcum. Soil Biol. Biochem., 21, 967-972.
- NOHRSDT, H-O. 1983. Natural formation of ethylene in forest soils and methods to correct the results given by acetylene reduction assay. Soil Biol. biochem., 16, 19-22.
- NÖMMIK, H. y LARSSON, K. 1989. Measurement of denitrification rate in undisturbed soil cores under different temperature and moisture conditions using  $^{15}\text{N}$  tracer technique. Swedish J. Agric. Res., 19, 35-44.
- NYE, P.H. 1981. Changes in pH across the rhizosphere induced by roots. Plant and Soil, 61, 7-26.
- OLSEN, S.R. 1954. Estimation of available phosphorus by extraction with sodium bicarbonate. U.S.D.A. Circ. Nº 939.
- OLSON, R.K y RAINERS, W.A. 1983. Nitrification in subalpine balsam fir soils: test for inhibitory factors. Soil Biol. Biochem., 15, 413-418.
- ORCHARD, V.A., COOK, F.J. 1983. Relationship between soil respiration and soil moisture. Soil Biol. Biochem., 15, 447-453.
- OZOLINA, Growth of cereal roots in different concentrations of metal ions. En: Plants Roots and Their Environment. B.L. McMichael y H. Persson (eds.). Proc. del ISRR simposium, Upsala (Suecia). Elsevier. Amsterdam. 136-142 pp.
- PAPAVIZAS, G.C. y DAVEY, C.B. 1961. Extent and nature of the rhizosphere of Lupinus. Plant and Soil, 14, 215-236.
- PAYANE, P.I., CORNFIELD, K.G., HOLT, L.M. y BLACKMAN, J.A. 1981. High molecular-weight subunits of glutenin and bread making quality in pathogeny of six crosses of bread wheat. J. Sci. Food. Agric., 32, 51-60.
- PAYNE, W.J. 1973. Reduction of nitrogenous oxides by microorganisms. Bacteriol. Reviews, 37, 409-452.
- PEREZ HERNANDEZ, M.C., MULLER, A. y BERMUDEZ DE CASTRO, F. 1989. Regulación de microorganismos del ciclo del nitrógeno por Alnus glutinosa. Studia Oecologica, 6, 245-263.
- PETERS, N.K., FROST, J.W. y LONG, S.R. 1986. A plant flavone, luteolin, induces expression of Rhizobium meliloti nodulation genes. Science, 233, 977-980.

- POCHON, J. y TARDIEUX, P. 1962. Techniques d'analyse en microbiologie du sol. Editions de la Tourelle. St. Mandè.
- POWERS, R.F. 1990. Nitrogen mineralization along an altitudinal gradient: interactions of soil temperature, moisture and subsequent quality. For. Ecol. Manage., 30, 19-29.
- POZUELO, J. M. 1984. Modificaciones estivales de la microflora edáfica de los ciclos del carbono y nitrógeno bajo Myrica gale L. Tesis de Licenciatura. Univ. Complutense.
- POZUELO, J.M. 1991. Estudio de los grupos funcionales de microorganismos edáficos en la rizosfera de Alnus glutinosa L. Gaertn. Tesis Doctoral. Univ. Complutense. Madrid.
- PRAKASAN, T. B. S. y LOEHR, R. C. 1972. Microbial nitrification and denitrification in concentrated wastes. Water Res., 6, 859-869.
- PRIKRYL, Z., VANCURA, V. y WURST, M. 1985. Auxin formation by rhizosphere bacteria as a factor of root growth. Biol. Plantarum, 27, 159-163.
- PROBANZA, A. 1991. Efectos de los exudados nodulares de Alnus glutinosa (L.) Gaertn. sobre los grupos funcionales del ciclo del nitrógeno. Memoria de Licenciatura. Univ. Complutense de Madrid. 76 pp.
- REDMOND, J.W., BATLEY, M., DJORDJEVIC, M.A., INNES, R.W., KUEMPEL, P.L. y ROLFE, B.G. 1986. Flavones induce expresion of nodulation genes in Rhizobium. Nature, 323, 623-635.
- REID, C.C.P. 1974. Assimilation, distribution and root exudation of C-14 by ponderosa pine seedlings under induced water stress. Plant Physiology, 54, 44-49.
- REID, J.B. y GOSS, M.J. 1980. changes in aggregate stability of a sandy loam affected by growing roots of perennial ryegrass (Lolium perenne). J. Sci. Food. agric., 31, 325-328.
- REMACLE, J. y DE LEVAL, J. 1975. L'application des indices de richesse et d'activité pour la caracterisation microbologique des sols. Rev. Ecol. Biol. Sol., 12, 193-199.
- RICE, E. L. (ed.). 1984. Allelopathy. Segunda edición. Academic. Nueva York.
- RICE, E.L. y PANCHOLY, S.K. 1972. Inhibition of nitrification in climax ecosystems. An. J. Bot., 59, 1033-1040.
- RICE, E.L. y PANCHOLY, S.K. 1974. Inhibition of nitrification in climax ecosystems. III. Inhibitors others than tanins. An. J. Bot., 61, 1095-1103.
- RICE, W.A. y PAUL, E.A. 1971. The acetilene reduction assay for measuring nitrogen fixation in waterlogged soil. Can. J. Microbiol., 17, 1049-1056.
- RICHARD, B.N. 1972. Introduction to soil ecosystems. Longmans Ed. Harlow.

RINAUDO, G., BLANDREAU, J. y DOMMENGUERS, Y. 1971. Algal and bacterial non-symbiotic nitrogen fixation in paddy soils. Plant and Soil Spec. Vol., 417-479.

ROBERTSON, G. P. y VITOUSEK, P. M. 1981. Nitrification potentials in primary and secondary succession. Ecology, 62, 376-386.

RODRIGUEZ-BARRUECO, C., MIGUEL, C. y PALMI, L.M. 1979. Cytokinins in root-nodules of the nitrogen-fixing non-legume Myrica gale L. Z. Pflanzenphysiol., 95, 275-278.

ROLSTON, D.E., FRIED, M. y GOLDHAMER, D.A. 1976. Denitrification measured directly from nitrogen and nitrous fluxes. Soil Sci. Soc. Am. J., 40, 259-266.

ROSEMBLUM, E.G. y WILSON, P. W. 1949. Fixation of isotopic nitrogen by Clostridium. J. Bacteriol., 57, 413-414.

ROSWAL, T. y PAUISTIAN, K. 1984. Cycling nitrogen in modern agricultural systems. Plant and Soil, 76, 1-48.

ROUATT, J.W. y KATZNELSON, H. 1961. A study of the bacteria on the root surface and in the rhizosphere soil of crop plants. J. Appl. Bact., 24, 164-171.

ROUATT, J.W., PETERSON, E.A. y KATZNELSON, H. 1963. Microorganisms in the root zone in relation to temperature. Can. J. Microbiol., 9, 227-236.

ROVIRA, A.D. 1959. Root excretions in relation to the rhizosphere effect. Plant and Soil, 11, 53-64.

ROVIRA, A.D. 1965. Interactions between plant roots and soil microorganisms. Annu. Rev. Microbiol., 19, 241-266.

ROVIRA, A. D. 1969. Plant root exudates. Bot. Rev., 35, 35-57.

ROVIRA, A.D. 1979. The soil-root interface. J.L. Harley y R.S. Russell (eds.). Academic Press. Londres.

ROVIRA, A.D. y BOWEN, G.D. 1966. The effects of microorganisms upon plant growth. II. Detoxification of heat-sterilized soils by fungi and bacteria. Plant and Soil, 25, 129-142.

ROVIRA, A.D. y DAVEY, C.B. 1974. Biology of the rhizosphere. En: The plant root and its environment. E.W. Carson (eds.). Univ. Virginia Press. Charlottesville. 153-204 pp.

ROVIRA, A.D., FOSTER, R.C. y MARTIN, J.K. 1979. Note on terminology: origin, nature and nomenclature of the organic materials in the rhizosphere. En: The soil-root interface. J.L. Harley y R. S. Russell (eds.). Academic Press. Londres. 1-4 pp.

ROVIRA, A. D. y McDOUGALL, B. 1967. Microbiological and biochemical aspects on the rhizosphere. En: Soil Biochemistry. A. D. McLaren y G. G. Petersen (eds.). Marcel Dekker. Nueva York. Vol I. 417-463.



- ROVIRA, A.D., NEWMAN, E.I., BOWEN, H.J. y CAMPBELL, R. 1974. Quantitative assessment of the rhizoplane bacteria microflora by direct microscopy. Soil Biol. Biochem., 6, 211-216.
- RUSSELL, R.S. 1977. Plant root systems. Their function and interaction with the soil. Mc Graw, Hill. Londres. 298 pp.
- RYDEN, J.C. 1981. N<sub>2</sub>O exchanges between a grassland soil and the atmosphere. Nature, 292, 235-37.
- SAHRAWAT, K. L. 1982. Nitrificación in some tropical soils. Plant and Soil, 65, 281-286.
- SALERNO, M. y SARGADOY, M.A. 1990. Presencia y caracterización de Bacillus spp. aislados de suelos cultivables de la zona semiárida de la provincia de Buenos Aires, Argentina. Agrochimica, 34, 164-171.
- SARKAR, A.N., JENKINS, D.A. y WYNJONES, R.G. 1979. Modifications to mechanical and mineralogical composition of soil within the rhizosphere. En: The Soil-Root Interface. J.L. Harleuy y R. Scott-Russell (eds.). Academic Press Inc. Londres. 125-136 pp.
- SAVEY, B. R. 1967. Influence of soil moisture tension on nitrate accumulation in soils. Soil Sci. Soc. Proc., 33, 263-266.
- SCHIPPERS, B., BAKKER, A.W., BAKKER, P.A.H.M., WEISBEEK, P.J. y LUGTENBERG, B.J. 1986. Plant growing-inhibiting and stimulating rhizosphere microorganisms. En: Microbial communities in Soil. FEMS Symposium no. 33. V. Jensen, A. Kjoller y L.H. Sorensen (eds.). Elsevier Appl. Publ. Londres. 447 pp.
- SCHIPPERS, B., BAKKER, P.W., BAKKEN, P.A.H.M. y VAN PEER, R. 1991. Beneficial and deleterious effects of HCN-producing pseudomonads on rhizosphere interactions. En: The rhizosphere and plant Growth. L. Keister y P.B. Cregan (eds.). Kluwer Acad. Pub. Holanda. 211-219 pp.
- SCHMIDT, E.L. 1973. The traditional plate count technique among modern methods. Ecol. Bull. (Estocolmo), 17, 453-454.
- SCHROTH, M.N., LOPER, J.E. y HILDEBRAND, D.C. 1984. Bacteria as biocontrol agents of plant disease. En: Current perspectives in microbial ecology. M. J. Klug y C. A. Reddy (eds.). Am. Soc. Microbiol. Washington DC. 362-369 pp.
- SCHWINTZER, C.R. 1979. Nitrogen fixation by Myrica gale root nodules in a Massachussets wetland. Oecologia, 43, 283-294.
- SCHWINTZER, C.R., BERRY, A.M. y DISNEY, L.D. 1982. Seasonal patterns of root nodule growth, endophyte morphology, nitrogenase activity and shoot development in Myrica gale. Can. J. Bot., 60, 746-757.
- SCOTT-SMITH, M. 1982. Dissimilatory reduction of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> to NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and N<sub>2</sub>O by a soil Citrobacter ssp. Appl. Environ. Microbiol., 43, 854-860.
- SEIFERET, J. 1969. Influence of the size of soil structural aggregates on the degree of nitrification. Folia. Microb., 9, 115-120.

SEVILLANO, F. y RODRIGUEZ-BARRUECO, C. 1987. Sistemas simbióticos fijadores de nitrógeno de interés aplicado en agricultura. En: Avances en la biología de la fijación simbiótica de nitrógeno atmosférico. M. Megias y F. Ruiz (eds.). Servicio de publicaciones de la Universidad de Sevilla. 9-29 pp.

SHAY, F.J. y HALE, M.G. 1973. Effect of low levels of calcium on exudation of sugars and sugar derivatives from intact peanut root under axenic conditions. Plant Physiol., 51, 1061-1063.

SHEARMAN, C.A., ROSSEN, L., JOHNSTON, A.W.B. y DOWNIE, J.A. 1986. The Rhizobium leguminosarum nodulation gene nodF encodes a polypeptide similar to acyl carrier protein and is regulated by nodD plus a factor in pea root exudate. EMBO J., 5, 647-652.

SHEPPARD, L.J., HOOKER, J.E., WHEELER, C.T. y SMITH, R.I. 1989. Glass-house evaluation of the growth of Alnus rubra and Alnus glutinosa on peat and acid brown earth soils when inoculated with four sources of Frankia. En: Nitrogen fixation with non-legumes. F. A. Skinner, R. M. Boddey y I. Fendrik (eds.). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht. 35-46 pp.

SHERWOOD, J.E. y KLEIN, D.A. 1980. Antibiotic-resistant Arthobacter sp. and Pseudomonas sp. responses in the rhizosphere of blue-grass after herbage removal. Plant and Soil, 62, 91-96.

SILVESTER, W.B. 1977. Dinitrogen fixation by plants associations excluding legumes. En: A treatise on dinitrogen fixation IV. R.W.F. Hardy y A.H. Gibson (eds.). John Wiley and sons. Nueva York. 141-190 pp.

SILVESTER, W. B., SILVESTER, J. K. y TORREY, J. G. 1988. Adaptation of nitrogenase to varying oxygen tension and the role of the vesicle in root nodules of Alnus incana ssp. rogosa. Can. J. Bot., 66, 1772-1779.

SIMON-SYLVESTRE, G. y CALVET, R. 1987. Nitrification dans un système experimental modélisé. Agronomie, 7, 303-312.

SKUJIN, J. 1981. Nitrogen cycling in arid ecosystems. En: Terrestrial nitrogen cycles. F.E. Clarck y T. Rosswall (eds.). Ecoll. Bull. Estocolmo. 33, 23-73.

SMITH, W.H. 1969. Release of organic materials from the roots of the tree seedlings. For. Sci., 15, 138-143.

SMITH, W.H. 1970. Root exudates of seedlings and mature sugar maple. Phytopathology, 60, 701-703.

SMITH, M.S. y TIEDJE, J. M. 1979. The effect of roots on soil denitrification. Soil Sci. Soc. Am. J., 43, 951-955.

SMUCKER, A.J.M. y ERICSON, A.E. 1987. Anaerobic stimulation of root exudates and disease of peas. Plant and Soil, 99, 423-433.

SOKAL, R.R. y ROHLF, F.J. 1979. Biometría. H. Blume (ed.). 832 pp.

SOLOUCHANA, C. B. 1962. Amino acids in root exudates of cotton. Plant and Soil, 26, 312-326.

- SOLOMONSON, L.P. 1981. Cyanide as a metabolite inhibitor. En: Cyanide in Biology. B. Benesland et al. (eds.). Academic Press. Londres. 11-28 pp.
- SPRENT, J. L. 1990. The biology of nitrogen transformations. Soil Use and Management, 6, 74-77.
- STANDFORD, G. y EPSTEIN, E. 1974. Nitrogen mineralization : water relation in soils. Soil Sci. Soc. Am. Proc., 38, 103-107.
- STANDFORD, G., FRERE, M. H. y SCHWANINGER, D. H. 1973. Temperature coeficient of soil nitrogen-mineralization. Soil Sci., 115, 321-323.
- STANFORD, G. y SMITH, S. J. 1972. Nitrogen mineralization potentials of soils. Soil Sci. Soc. Amer. Proc., 36, 465-472.
- STANDFORD, G., VANDERPOL, R. A. y DZIENIA, S. 1975. Denitrification rates in relation to total and extractable soil carbon. Soil Sci. Am. Proc., 39, 284-289.
- STARKEY, R.L. 1929. Some influences of development of higher plants upon the microorganisms in the soil. I. Historical and introductory. Soil Sci., 27, 319-334.
- STARR, J. L. y PARLANGE, J. Y. 1975. Nonlinear denitrification Kinetics with continous flow in soil columns. Soil. Sci. Soc. Am. Proc., 39, 875-880.
- STEFANSEN, R.C. 1973. Evolution patterns of nitrous oxide and nitrogen in sealed soil-plant systems. Soil Biol. Biochem., 14, 51-55.
- STEINBERG, R.A. 1947. Growth response of tobacco seedlings in aseptic culture to diffusates of some common soil bacteria. Jour. Agric. Res., 75, 199-206.
- STEWART, W. D. P. 1974. Blue-green algae. En: The biology of nitrogen fixation. A. Quispel (ed.). North Holand. Publ. Co. Amsterdam. 202-237.
- STRUWE, S. y KJOLLER, A. 1986. Changes in population structure during decomposition. En: Microbial communities in soil. V. Jensen; A. Kjoller y L.H. Sorensen (eds.). Elsevier Applied Science Publishers Ltd. Londres. 149-162 pp.
- STRUWE, S. y KJOLLER, A. 1990. Seasonality of denitrification in water-logged alder stands. Plant and Soil, 128, 109-113.
- SVENNINGSSON, H. y LILJERBERG, C. 1986. Membrane lipid changes in root cells of rape (Brassica napus) as a function of water-deficit stress. Physiol. Plant., 68, 53-58.
- SVENNINGSSON, H., SUNDIN, P. y LILJENBERG, C. 1990. Lipids, carbohydrates and amino acids exuded from the axenic roots of rape seedlings exposed to water-deficit stress. Plant cell Envirom., 13, 155-162.
- TARRANT, R.F. y TRAPPE, J.M. 1971. The role of Alnus in improving the forest enviroment. Plant and Soil. Special Vol., 335-348.

- TATE, R.L. 1985. Microorganisms, ecosystems disturbance and soil formation processes. En: Soil reclamation processes, microbial analyses and applications. R.L. Tate III y A.K. Donnal (eds.). 1-3 pp.
- TAYLOR, B.R. y PARKINSON, D. 1988. Does repeated wetting and drying accelerate decay of leaf litter? Soil Biol. Biochem., 20, 287-292.
- TERRY, R.E. Y TATE, R.L. 1980. Effect of flooding on microbial activities in organic soils: nitrogen transformations. Soil Sci., 129, 88-91.
- THERON, J.J. 1959. The influence of plants on the mineralization of nitrogen and maintenance of organic matter in soil. J. Agri. Sci., 41, 289-296.
- THROWER, L.B. 1954. The rhizosphere effect shown by some Victorian heathland plants. Aust. J. Bot., 2, 246-267.
- TIEDJE, J. M., SEXSTONE, A. J., MYROLD, D. D. Y ROBINSON, J. A. 1982. Denitrification: Ecological niches, competition and survival. Antonie Vaan Leewenhoke. J. Ser. Microbiol., 48, 197-212.
- TIEDJE, J.M., SEXSTONE, A.J., PARKIN, T.B. y REVSBECH, N.P. 1984. Anaerobic processes in soil. Plant and Soil, 70, 197-212.
- TIESSEN, H., STEWART, J.W.B. y HUNT, H.W. 1984. Concepts of soil organic matter transformation in relation to organo-mineral particle size fractions. Plant and Soil, 76, 287-295.
- TURNER, D.P. y FRANTZ, E.H. 1985. The influence of western hemlock and western redcedar on microbial numbers, nitrogen mineralization, and nitrification. Plant and Soil, 88, 259-267.
- VAN EGERAAT, A. W. S. M. 1979. Root exudates and microbial growth in the interface. En: The Soil-Root Interface. J. L. Harley y R. Scot Russell (eds.). Academic Press. Londres.
- VAN GENT-KUYTERS, J.L.W., DE VRIES, W. Y STOUTHAMER, A.H. 1975. Influence of nitrate on fermentation pattern, molar growth yield, and synthesis of cytochrome b in Propionobacterium pentosaceum. J. Gen. Microbiol., 88, 36-48.
- VANCURA, V. 1964. Root exudates of plants. Plant and Soil, 21, 231-248.
- VANCURA, V. y HANLIKOVA, A. 1972. Root exudates in plants. IV. Differences in chemical composition of seed and seedlings exudates. Plant and Soil, 36, 271-282.
- VANCURA, V. y HOVADIC, A. 1965. Root exudates of plants. II. Composition of root exudates of some vegetables. Plant and Soil, 27, 21-32.
- VELASCO, F. y LOZANO, J. M. 1979. Cambios sinecológicos de la microflora telúrica asociados a las repoblaciones forestales con especies exóticas. An. Edafol. Agrobiol., 38, 871-879.
- VERSTRATE, W. 1981. Nitrification. Ecol. Bull. (Stockholm), 33, 303-314.

VILKMAN, P.-A., LUNDQUIST, P.O. y HUSS-DANEL, K., 1990. Respiratory capacity, nitrogenase activity and structural changes of Frankia, in symbiosis with Alnus incana. Physiol. Plant., 71, 489-494.

VINTHER, F. P. 1984. Total denitrification and the ratio between  $N_2O$  and  $N_2$  during the growth of spring barley. Plant and Soil, 76, 227-232.

VITOUSEK, P.M., GOSZ, J.R., GRIER, C.C., MELILLO, J.M. y REINERS, W.A. 1982. A comparative analysis potential nitrification and nitrate mobility in forest ecosystems. Ecol. Monographs., 52, 155-157.

WALKER, D.W. y MILLER, J.C. 1986. Influence of water stress on nitrogen fixation in cowpea. J. Amer. Hort. Sci., 111, 451-458.

WALKLEY, A. y BLACK, I.A. 1934. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titulation method. Soil. Sci., 37, 29-38.

WATRUD, L.S., PERLAK, F.J., TRAN, M.T., KUSANO, K., MAYER, E.J., MILLER-WIDEMAN, M.A., OBUKOWICZ, M.G., NELSON, D.R., KREITINGER, J.P. y KAUFMAN, J.R. 1985. Cloning of the Bacillus thuringiensis subsp kurstaki delta-endotoxin gene into Pseudomonas fluorescens. Molecular biology and ecology of an engineered microbial pesticide. En: Engineered organisms in the environment. H.O. Halvorson, O. Pramer y M. Rogul (eds.). Scientific issues. Am. Soc. Microbiol. Washington DC. 40-46 pp.

WEBER, A. NURMIAHO-LASSALIA, E. y SUNDMAN, V. 1987. Features of intragenetic Alnus-Frankia specificity. Physiol. Plant., 70, 289-296.

WERNER, D., KROTZKY, A., BERGGOLD, B., THIERFELDER, H. y PREISS, M. 1982. Enhancement of specific nitrogenase activity in Azospirillum brasilense, Klebsiella pneumoniae, inhibition in Rhizobium japonicum under air by phenol. Arch. Microbiol., 132, 51-56.

WHIPPS, J. M. 1984. Environmental factors affecting the loss of carbon from the roots of wheat and barley seedlings. J. Exp. Bot., 53, 767-773.

WHIPPS, J.M. 1990. Carbon economy. En: The rhizosphere. J.M. Lynch (ed.). John Wiley and sons. Chichester. 59-97 pp.

WHIPPS, J.M. y LYNCH, J.M. 1986. The influence of the rhizosphere on crop productivity. Adv. Microbiol. Ecol., 9, 187-244.

WILD, A. (ed.). 1988. Russell's soil conditions and plant growth. 11<sup>th</sup> edn. Logman. Londres. 991 pp.

WOLK, C.P., THOMAS, J.C. y SHAFFER, P.W. 1976. Pathway of nitrogen metabolism after fixation of  $^{15}N$ -labelled nitrogen gas by the cyanobacterium Anabaena cylindrica. J. Biol. Chemistry., 251, 5027-5034.

WOLDENDROP, J. W. 1965. Quantitative influence of the rhizosphere on denitrification. Plant and Soil, 17, 267-270.

WONG, P. P. y BURRIS, R. H. 1972. Nature of oxygen inhibition of nitrogenase from Azotobacter vinelandii. Proc. Acad. Sci. U.S.A., 69, 672-675.

WORTHINGTON, E.B. 1975. The evolution of IBP. Cambridge Univ. Press. Cambridge. 268 pp.

YORDY, D.M. y RUOFF, K.L. 1981. Dissimilatory nitrate reduction to ammonia. En: Denitrification, nitrification and atmospheric nitrous oxide. C. C. Delwiche (ed.). John Wiley and Sons. Nueva York. 171-190 pp.

YOSHINARI, T. Y KNOWLES, K. 1976. Acetylene inhibition of nitrous oxide reduction by denitrifying bacteria. Biochem. Biofis. Res. Com., 69, 705-710.

ZAAT, S.A.J., VAN BRUSSEL, A.A.N., TAK, T., PEES, E. y LUGTENBERG, B.J.J. 1987. Flavonoids induce Rhizobium leguminosarum to produce nodDABC gene related factors that cause thick, short roots and root hair responses on common vetch. J. Bacteriol., 169, 3388-3391.

## 10. APENDICES

## APENDICE A

### A.I.1. Fórmula de la solución nutritiva Crone

$\text{KNO}_3$	1.00 g
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.50 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.50 g
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	0.25 g
$\text{Fe}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	0.25 g
Agua destilada	1.00 l

En la fórmula libre de nitrógeno se sustituye el  $\text{NO}_3\text{K}$  por 0.75 g de  $\text{ClK}$ .  
A cada litro de solución se le añade 1 ml de la solución de oligoelementos A-Z de Haogland, cuya composición es la siguiente:

$\text{Li}_2\text{SO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.064 g	$\text{TiO}_3$	0.055 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.055 g	$\text{KI}$	0.035 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.098 g	$\text{KBr}$	0.035 g
$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$	0.055 g	$\text{Na}_2\text{SiO}_3$	0.430 g
$\text{NiSO}_4$	0.055 g	$\text{KMnO}_4$	0.400 g
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0.620 g	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.035 g
$\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.041 g		
$\text{MnCl}_2$	0.400 g		
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.100 g		

### A.I.2. Solución extractora para nitratos

La composición de la solución extractora es:

$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18 \text{H}_2\text{O}$	16.66 g
$\text{H}_3\text{BO}_3$	1.24 g
$\text{Ag}_2\text{SO}_4$	4.67 g
$\text{NH}_4\text{HSO}_3$	2.43 g
Agua destilada	1000 ml



**A.II.1. Solución de oligoelementos, extracto de tierra y solución salina de Winogradsky. Medio de siembra de suspensiones diluciones.**

**Solución de oligoelementos**

$\text{Na}_2(\text{MoO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.05 g
$\text{K}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	0.05 g
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.05 g
$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.05 g
$\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.05 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05 g
Agua destilada	1000 ml

**Extracto de tierra**

Se preparó con tierra de la zona de muestreo recogida entre 10 y 15 cm de profundidad.

La tierra se mezcló con agua destilada en proporción 1:1 (p/v) y cada litro se enriqueció con un ml de la solución de oligoelementos. La solución resultante se introdujo en el autoclave donde permaneció una hora a 130°C. Se dejó reposar y se filtró por papel. El filtrado se esterilizó en autoclave durante 30 min a 115°C.

**Solución salina de Winogradsky**

$\text{K}_2\text{HPO}_4$	5.0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.5 g
$\text{NaCl}$	2.5 g
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.05 g
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	0.05 g
Agua destilada	1000 ml

Se añadió un ml de la solución salina de oligoelementos a 110°C, y posteriormente se ajustó el pH entre 7.0 y 7.5 con una solución de NaOH al 10% (p/v).

Un ml de las suspensiones-diluciones de cada una de las réplicas se sembró en un medio que contenía:

Agar para métodos estandar (Pronadisa)	23.5	g
Solución salina de Winogradsky	50	ml
Oligoelementos (Pochon y Tardieux, 1962)	1	ml
Extracto de suelo	10	ml
Agua destilada hasta	1	l

Las placas se incubaron a 28°C durante 36 horas.

#### A.II.2. Reactivos y medios de cultivo utilizados en el análisis de algunos grupos funcionales

##### a) Reactivo de Nessler

###### Solución A

HgI <sub>2</sub>	50	g
KI	36.5	g
Agua destilada	1000	ml

###### Solución B

KOH	150	g
Agua destilada	1000	ml

En el momento de usarlo se mezclaron volúmenes iguales de las soluciones A y B.

##### b) Reactivo de la difenilamina sulfúrica

NH(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>	10	g
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1000	ml
Agua destilada	200	ml

##### c) Medio para microorganismos diazotróficos aerobios

Solución salina	50	ml
Manitol	10	ml
Extracto de tierra	10	ml
Oligoelementos	1	ml
CaCO <sub>3</sub>	0.5	gr
Agua destilada	1000	ml

d) Medio para microorganismos diazotróficos anaerobios

Solución salina	50 ml
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.75 g
$\text{NaOH}(0.1\text{N})$	33 ml
Glucosa	10 g
Extracto de tierra	10 ml
Oligoelementos	1 ml
Agua destilada	1000 ml

e) Medio para amonificantes

Solución salina	50 ml
Asparagina	0.2 g
Oligoelementos	1 ml
Agua destilada	950 ml

f) Medio para nitrificantes nitrosos

Solución salina	50 ml
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.5 g
$\text{CaCO}_3$	1 g
Agua destilada	1000 g

g) Medio de nitrificantes nítricos

Solución salina	50 ml
$\text{NaNO}_2$	1 g
$\text{CaCO}_3$	1 g
Agua destilada	950 ml

h) Medio para desnitrificantes

Solución salina	50	ml
KNO <sub>3</sub>	2	g
Glucosa	10	g
CaCO <sub>3</sub>	5	g
Oligoelementos	1	ml
Agua destilada	1000	ml

i) Reactivos empleados en los tests API-10

\* Reactivo para TDA

FeCl <sub>3</sub>	3.4	g
Agua destilada	100	ml

\* Reactivo para IND

p-dimteilaminobenzoaldehido	5	g
Alcohol isoamílico	75	ml
HCl 37%	25	ml

\* Reactivos para detección de nitritos

NIT1

Acido sulfanílico	0.8	g
Acido acético 5N	100	ml

NIT2

N-N-dimetil-1-naftilamina	0.6	g
Acido acético 5N	100	ml

\* Reactivo para OX

Tetrametil-p-fenildiamina	1	g
Alcohol isoamílico	100	ml

### A.II.3. Tampón de extracción de proteínas para las electroforesis de SDS-PAGE de semillas

<u>Solución de Stock.</u>			<u>Tampón de Extracción</u>		
20	ml	Glicerol	Solución Stock	5.1	ml
122.5	ml	Tris 1M pH 6.8	Agua destilada	12	ml
24.1	ml	Agua destilada	2-Mercaptoetanol	0.9	ml
4	g	SDS			
20	mg	Pironina Y			

### A.II.4 Composición de los geles de SDS-PAGE.

<u>Gel principal (17%)</u>			<u>Stacking (3%)</u>		
Acrilamida 25%	24.6	ml	Acrilamida	600	mg
Bis-acrilamida 2%	1.94	ml	Bis-acrilamida	16	mg
Agua destilada	2.21	ml	SDS	20	mg
Tris 1M pH 8.8	18.8	ml	Tris HCl 0.125M pH 6.8	20	ml
SDS 10%	0.5	ml	Amonio persulfato 10%	100	µl
Amonio persulfato 1%	1.25	ml	TEMED	16	µl
TEMED	25	µl			

Siendo la composición del tampón de electrodos:

Glicina	56.44	g
Tris	12	g
SDS	4	g
Agua destilada	4	l

## APENDICE B

B.I. LSD de la interacción entre suelos y tratamientos (exudados y controles) en el estudio sobre el ARA de exudados nodulares y radicales

SUELO A		N										R				
		T1N	T2N	T3N	T1R	T2R	T3R	C	2C	C+E	C+M	C	2C	C+E	C+M	Ca
R	Mo	**	**	**	**	**	**	NS	**	**	**	*	NS	NS	**	**
	Ca	*	NS	NS	NS	NS	NS	**	**	**	*	**	**	**	**	
	C+M	**	**	**	**	**	**	**	NS	**	**	**	*	*		
	C+E	**	**	**	**	**	**	*	*	**	**	**	NS			
	2C	**	**	**	**	**	**	NS	*	**	**	**				
	C	NS	**	**	**	**	**	NS	**	**	NS					
	C+M	NS	*	*	NS	*	*	*	**	**						
	C+E	**	**	**	**	**	**	**	**							
	2C	**	**	**	**	**	**	**								
	C	*	**	**	**	**	**									
N	T3R	*	NS	NS	NS	NS										
	T2R	*	NS	NS	NS											
	T1R	NS	NS	NS												
	T3N	*	NS													
	T2N	*														
	T1N															

SUELO B		N										R				
		T1N	T2N	T3N	T1R	T2R	T3R	C	2C	C+E	C+M	C	2C	C+E	C+M	Ca
R	Mo	*	**	**	*	**	**	NS	**	**	*	*	NS	**	*	**
	Ca	**	NS	NS	*	NS	NS	**	**	**	*	*	**	**	**	
	C+M	**	**	**	**	**	**	**	NS	**	**	**	NS	**		
	C+E	**	**	**	**	**	**	**	**	NS	**	**	**			
	2C	**	**	**	**	**	*	*	*	**	**	**				
	C	NS	*	*	*	*	*	*	**	**	NS					
	C+M	NS	*	*	*	*	*	*	**	**						
	C+E	**	**	**	**	**	**	**	**							
	2C	**	**	**	**	**	**	**								
	C	*	**	**	*	**	**									
N	T3R	**	NS	NS	*	NS										
	T2R	**	NS	NS	*											
	T1R	NS	*	*												
	T3N	**	NS													
	T2N	**														
	T1N															

SUELO C		N										R				
		T1N	T2N	T3N	T1R	T2R	T3R	C	2C	C+E	C+M	C	2C	C+E	C+M	Ca
R	Mo	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**	**	NS	NS	**	**	NS	NS
	Ca	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	**	**	NS	NS	**	**	NS	
	C+M	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**	**	NS	NS	**	**		
	C+E	**	**	**	**	**	**	**	NS	**	**	**	**			
	2C	**	**	**	**	**	**	*	**	**	**	**				
	C	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**	**	NS					
	C+M	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**	**						
	C+E	**	**	**	**	**	**	**	**							
	2C	**	**	**	**	**	**	**								
	C	NS	*	*	NS	*	*									
N	T3R	NS	NS	NS	NS	NS										
	T2R	NS	NS	NS	NS											
	T1R	NS	NS	NS												
	T3N	NS	NS													
	T2N	NS														

SUELO D		N										R				
		T1N	T2N	T3N	T1R	T2R	T3R	C	2C	C+E	C+M	C	2C	C+E	C+M	Ca
R	Mo	NS	*	*	NS	*	*	*	**	**	NS	NS	**	**	NS	*
	Ca	*	NS	NS	NS	NS	NS	**	**	**	*	*	**	**	*	
	C+M	NS	*	*	NS	*	**	*	**	**	NS	NS	**	**		
	C+E	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**			
	2C	**	**	**	**	**	**	NS	*	**	**	**				
	C	NS	**	**	NS	**	**	*	**	**	NS					
	C+M	NS	*	*	NS	*	*	**	**	**						
	C+E	**	**	**	**	**	**	**	**							
	2C	**	**	**	**	**	**	**								
	C	**	**	**	**	**	**									
N	T3R	*	NS	NS	*	NS										
	T2R	*	NS	NS	*											
	T1R	NS	NS	NS												
	T3N	*	NS													
	T2N	*														

**B.II. LSD de la interacción entre suelos y tratamientos (exudados y controles)  
en el estudio sobre el ARA de exudados de PN y PSN**

		PN										PSN									
		T1	T2	T3	T1	T2	T3	C	2C	C+E	C+M	C	2C	C+E	C+M	Ca	Mo	CN			
PSN	SN	**	*	NS	NS	NS	NS	**	**	**	**	**	NS	*	NS	**	NS	**	NS		
	CN	**	NS	NS	NS	NS	NS	*	**	**	**	**	NS	NS	NS	**	NS	**			
	Mo	**	**	**	**	**	**	**	NS	**	**	**	**	**	**	NS	**				
	Ca	**	*	NS	NS	NS	NS	**	**	**	**	**	NS	*	NS	**					
	C+M	**	**	**	**	**	**	**	NS	*	**	**	**	**	**						
	C+E	**	*	NS	NS	NS	NS	*	**	**	**	**	NS	NS							
	2C	**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*	**	**	**	NS								
	C	**	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**	**	**	**	**								
	C+M	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**									
	C+E	**	**	**	**	**	**	**	**	NS											
PN	2C	**	**	**	**	**	**	**													
	C	NS	*	**	**	**	*														
	T3	**	NS	NS	*	NS															
	T2	**	NS	NS	NS																
	T1	**	**	NS																	
	T3	**	NS																		
	T2	**																			

Suelo A

\*, PN: plantas noduladas  
PSN: de plantas sin nodular

		PN										PSN									
		T1	T2	T3	T1	T2	T3	C	2C	C+E	C+M	C	2C	C+E	C+M	Ca	Mo	CN			
PSN	SN	**	**	**	NS	*	**	**	**	**	**	*	**	**	**	NS	**	NS			
	CN	**	**	**	NS	*	**	**	**	**	*	*	**	*	**	NS	**				
	Mo	**	**	**	**	**	**	**	*	**	**	**	**	**	**	NS	**				
	Ca	**	**	**	NS	*	**	**	**	**	*	*	**	*	**						
	C+M	**	**	**	**	**	**	**	*	**	**	**	**	**	*						
	C+E	**	**	*	NS	NS	**	**	**	**	*	NS	**								
	2C	**	*	NS	**	*	*	**	**	**	*	*									
	C	**	**	NS	NS	NS	**	**	**	*	*										
	C+M	**	**	**	**	**	**	**	**	*											
	C+E	**	**	**	**	**	**	**	**												
PN	2C	**	**	**	**	**	**	**													
	C	NS	**	**	**	**	**														
	T3	**	NS	**	**	**															
	T2	**	**	NS	NS																
	T1	**	**	*																	
	T3	**	**																		
	T2	**																			
	T1																				
	T3																				
	T2																				

Suelo B

\*, PN: plantas noduladas  
PSN: de plantas sin nodular

266



		PN										PSN									
		T1	T2	T3	T1	T2	T3	C	2C	C+EC+M	C	2C	C+EC+M	C	Ca	Mo	CN				
PSN	SN	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**	*	**	NS	NS	NS	**	NS	**	NS		
	CN	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**	NS	**	NS	NS	NS	**	NS	**			
	Mo	NS	*	*	*	*	NS	NS	NS	NS	*	*	NS	*	**	*					
	Ca	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**	*	**	NS	NS	NS	**					
	C+M	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**						
	C+E	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**	NS	**	NS	NS							
	2C	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**	NS	**	NS								
	C	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	**	NS	**									
	C+M	**	**	**	**	**	**	**	NS	**											
	C+E	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS											
PN	2C	*	**	**	**	*	*	*													
	C	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS													
	T3	NS	NS	NS	NS	NS	NS														
	T2	NS	NS	NS	NS	NS															
	T1	NS	NS	NS	NS																
	T3	NS	NS	NS																	
	T2	NS	NS																		
	T1	NS																			
	T3	NS																			
	T2	NS																			

\*, PN: plantas noduladas

PSN: de plantas sin nodular

Suelo C

\*, PN: plantas noduladas  
PSN: de plantas sin nodular

### Suelo C

		PN										PSN									
		T1	T2	T3	T1	T2	T3	C	2C	C+E	C+M	C	2C	C+E	C+M	Cb	Mo	CN			
PSN	SN	**	NS	NS	NS	NS	NS	**	**	**	**	**	NS	**	**	**	NS	**	NS		
	CN	**	NS	NS	NS	NS	NS	**	**	**	**	**	NS	**	**	**	NS	**			
	Mo	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**				
	Cb	**	NS	NS	NS	NS	NS	**	**	**	**	**	NS	**	**	**					
	C+M	**	**	**	**	**	**	NS	**	**	**	**	**	**	NS						
	C+E	**	**	**	**	**	**	*	*	**	**	**	**	**							
	2C	**	*	*	*	NS	NS	**	**	**	**	**	NS								
	C	**	NS	NS	NS	NS	NS	**	**	**	**	**									
	C+M	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**									
	C+E	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**									
PN	2C	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**										
	C	*	**	**	**	**	**	**	**	**	**										
	T3	**	*	*	*	NS															
	T2	**	NS	NS	NS																
	T1	**	NS	NS																	
	T3	**	NS																		
	T2	**																			
	T1																				
	T3																				
	T2																				

\*, PN: plantas  
PSN: de plantas

Suelo D

\*, PN: plantas noduladas  
PSN: de plantas sin nodular

### Suelo D

**B.III. LSD de la interacción entre suelos y tratamientos (exudados y controles) en el estudio sobre la amonificación de exudados nodulares y radicales**

**SUELO A**

	T1N	T2N	T3N	T1R	T2R	T3R	CAN	CAR
CA	*	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS
CAR	NS	NS	NS	*	NS	NS	NS	
CAN	*	NS	NS	*	NS	NS		
T3R	NS	NS	NS	*	NS			
T2R	*	NS	NS	*				
T1R	NS	*	*					
T3N	*	NS						
T2N	*							

**SUELO B**

	T1N	T2N	T3N	T1R	T2R	T3R	CAN	CAR
CA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	*
CAR	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
CAN	NS	NS	NS	NS	NS	NS		
T3R	NS	NS	NS	NS	NS			
T2R	NS	NS	NS	NS				
T1R	NS	NS	NS					
T3N	NS	NS						
T2N	NS							

**SUELO C**

	T1N	T2N	T3N	T1R	T2R	T3R	CAN	CAR
CA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CAR	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	
CAN	NS	NS	NS	NS	NS	NS		
T3R	NS	NS	NS	*	NS			
T2R	*	NS	NS	NS				
T1R	NS	NS	*					
T3N	NS	NS						
T2N	NS							

**SUELO D**

	T1N	T2N	T3N	T1R	T2R	T3R	CAN	CAR
CA	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
CAR	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	
CAN	NS	NS	NS	NS	NS	NS		
T3R	NS	NS	NS	NS	NS			
T2R	NS	NS	NS	NS				
T1R	NS	NS	NS					
T3N	NS	NS						
T2N	NS							

**B.IV. LSD de la interacción entre suelos y tratamientos (exudados y controles) en el estudio sobre la nitrificación de exudados nodulares y radicales**

**SUELO A**

	T1N	T2N	T3N	T1R	T2R	T3R	CNN	CNR
CA	**	**	NS	NS	NS	NS	**	*
CNR	**	NS	NS	NS	NS	NS	**	
CNN	NS	*	**	**	**	**		
T3R	**	**	NS	NS	NS			
T2R	**	*	NS	NS				
T1R	**	NS	NS					
T3N	**	*						
T2N	*							

**SUELO B**

	T1N	T2N	T3N	T1R	T2R	T3R	CNN	CNR
CA	NS	NS	*	NS	NS	NS	NS	NS
CNR	NS	*	**	NS	NS	NS	NS	
CNN	NS	NS	NS	NS	NS	NS		
T3R	NS	NS	*	NS	NS			
T2R	NS	NS	*	NS				
T1R	NS	*	*					
T3N	NS	**						
T2N	NS							

**SUELO D**

	T1N	T2N	T3N	T1R	T2R	T3R	CNN	CNR
CA	**	**	**	**	**	*	**	NS
CNR	**	**	**	**	**	**	**	
CNN	NS	*	**	**	**	**		
T3R	**	**	**	NS	NS			
T2R	**	**	**	NS				
T1R	**	**	*					
T3N	**	*						
T2N	*							

**B.V. LSD de la interacción entre suelos y tratamientos (exudados y controles)  
en el estudio sobre la nitrificación de exudados de PN y PSN**

	T1	T2	T3	T1	T2	T3	CN	CN	CN	SN		T1	T2	T3	T1	T2	T3	CN	CN	CN	SN
Ca	**	**	NS	**	**	NS	NS	NS	NS	NS	Ca	**	NS	NS	**	*	NS	NS	NS	NS	NS
SN	**	**	NS	**	**	NS	NS	NS	NS		SN	**	NS	NS	**	*	NS	NS	NS	NS	
CN	**	**	NS	**	**	*	NS	NS			CN	**	NS	**	*	NS	NS	NS			
° CN	**	**	NS	**	**	*	NS				° CN	**	*	NS	**	*	*	NS			
° CN	**	**	NS	**	*	NS					° CN	*	NS	NS	**	NS	NS				
T3	**	*	NS	**	*						T3	*	NS	NS	**	NS					
T2	*	*	**	**							T2	*	NS	NS	**						
T1	*	**	**								T1	NS	NS	**							
T3	**	**									T3	*	**								
T2	*										T2	*									
Suelo A											Suelo B										

Suelo A

Suelo B

°: Plantas noduladas

	T1	T2	T3	T1	T2	T3	CN	CN	CN	SN
Ca	**	**	NS	**	**	NS	**	**	NS	NS
SN	**	**	NS	**	**	NS	**	**	NS	
CN	**	**	NS	**	**	NS	**	**		
° CN	**	**	**	**	NS	**	NS			
° CN	**	**	**	**	NS	**				
T3	**	**	**	**	**					
T2	**	**	**	**						
T1	NS	**	**							
T3	**	**								
T2	**									

Suelo D

°: Plantas noduladas

**B.VI. LSD de la interacción entre suelos y tratamientos (exudados y controles)  
en el estudio sobre la desnitrificación de exudados nodulares y radicales**

**SUELO A**

		N						R					
		T1N	T2N	T3N	T1R	T2R	T3R	Co	2co	C+E	Co	2co	C+E
R	Ca	NS	*	**	**	NS	NS	NS	**	NS	NS	**	**
	C+E	*	NS	NS	NS	*	**	**	NS	*	**	NS	
	2co	**	**	NS	NS	**	**	**	NS	**	**		
	Co	NS	NS	**	**	NS	NS	NS	**	NS			
	C+E	NS	NS	*	*	NS	NS	NS	**				
	2co	**	*	NS	NS	*	**	**					
	Co	NS	NS	**	**	NS	NS						
	T3R	NS	*	**	**	NS							
	T2R	NS	NS	*	*								
	T1R	*	NS	NS									
N	T3N	*	NS										
	T2N	NS											

**SUELO B**

		N						R					
		T1N	T2N	T3N	T1R	T2R	T3R	Co	2co	C+E	Co	2co	C+E
R	Ca	NS	*	**	**	*	NS	NS	**	*	**	**	**
	C+E	**	*	*	*	**	**	**	**	**	*	NS	
	2co	**	*	*	*	**	**	**	**	**	*		
	Co	*	NS	NS	NS	*	**	**	NS	*			
	C+E	NS	*	*	*	NS	NS	NS	NS				
	2co	*	NS	NS	NS	NS	**	**					
	Co	NS	**	**	**	*	NS						
	T3R	NS	**	**	**	*							
	T2R	NS	NS	NS	*								
	T1R	*	NS	NS									
N	T3N	*	NS										
	T2N	*											

**SUELO C**

$\xleftarrow{\text{N}}$ 
 $\xrightarrow{\text{R}}$

	T1N	T2N	T3N	T1R	T2R	T3R	Co	2co	C+E	Co	2co	C+E
Ca	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS	NS	NS	**	**	**
C+E	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	NS	
2co	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**		
Co	**	**	*	NS	*	**	**	**	**			
C+E	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS	NS				
2co	NS	NS	NS	**	NS	NS	NS					
Co	NS	NS	NS	**	NS	NS						
T3R	NS	NS	NS	*	NS							
T2R	NS	NS	NS	*								
T1R	**	**	*									
T3N	NS	NS										
T2N	NS											

$\uparrow$  R  
 $\downarrow$  N

**SUELO D**

$\xleftarrow{\text{N}}$ 
 $\xrightarrow{\text{R}}$

	T1N	T2N	T3N	T1R	T2R	T3R	Co	2co	C+E	Co	2co	C+E
Ca	NS	**	**	**	NS	NS	NS	**	*	**	**	**
C+E	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	NS	
2co	**	**	**	**	**	**	**	*	**	**		
Co	*	NS	NS	NS	*	**	*	NS	NS			
C+E	NS	NS	*	NS	NS	*	NS	*				
2co	**	NS	NS	NS	**	**	**					
Co	NS	*	**	*	NS	NS						
T3R	NS	**	**	**	NS							
T2R	NS	*	**	*								
T1R	*	NS	NS									
T3N	**	NS										
T2N	*											

$\uparrow$  R  
 $\downarrow$  N

**B.VII. LSD de la interacción entre suelos y tratamientos (exudados y controles) en el estudio sobre la desnitrificación de exudados de PN y PSN**

		PN						PSN							
		T1	T2	T3	T1	T2	T3	C	2C	C+E	C	2C	C+E	Ca	CN
PSN	SN	**	NS	NS	**	**	NS	**	**	**	**	**	**	NS	**
	CN	**	**	**	*	*	**	**	**	*	*	NS	NS	**	
	Ca	**	NS	NS	**	**	NS	**	**	**	**	**	**		
	C+E	*	**	**	**	NS	**	*	NS	NS	NS	NS			
	2C	*	**	**	**	NS	**	*	NS	NS	NS				
	C	*	**	**	**	NS	**	NS	NS	NS					
PN	C+E	NS	**	**	**	NS	**	NS	NS						
	2C	NS	**	**	**	NS	**	NS							
	C	NS	*	**	**	NS	**								
	T3	**	NS	NS	**	**									
	T2	NS	**	**	**										
	T1	**	**	**											
	T3	**	NS												
	T2	*													

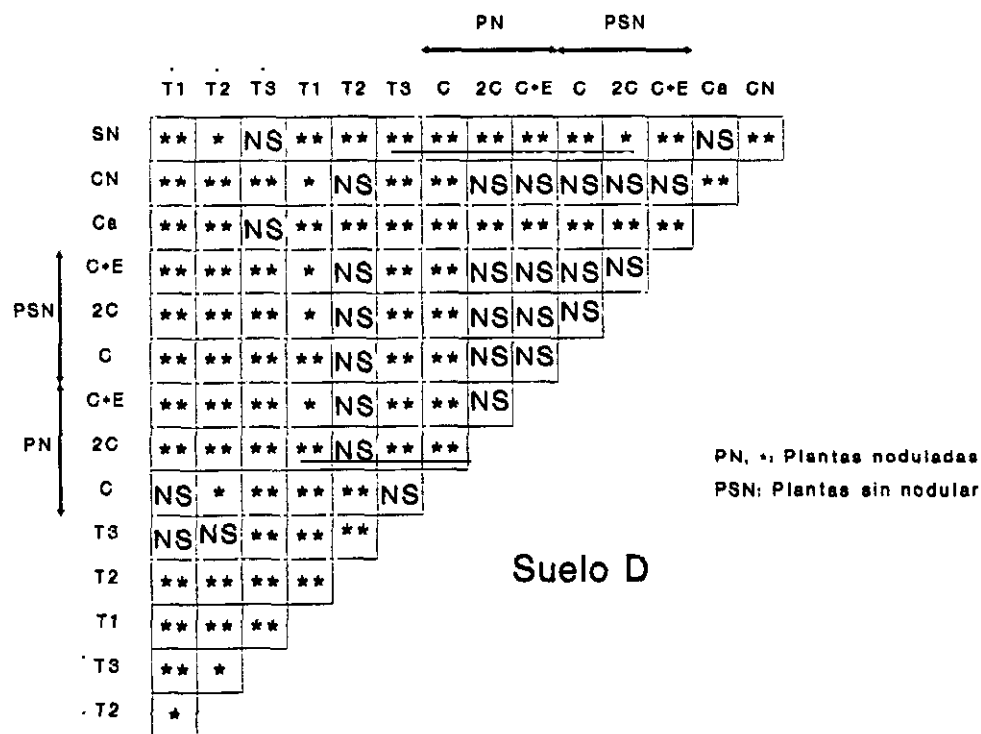
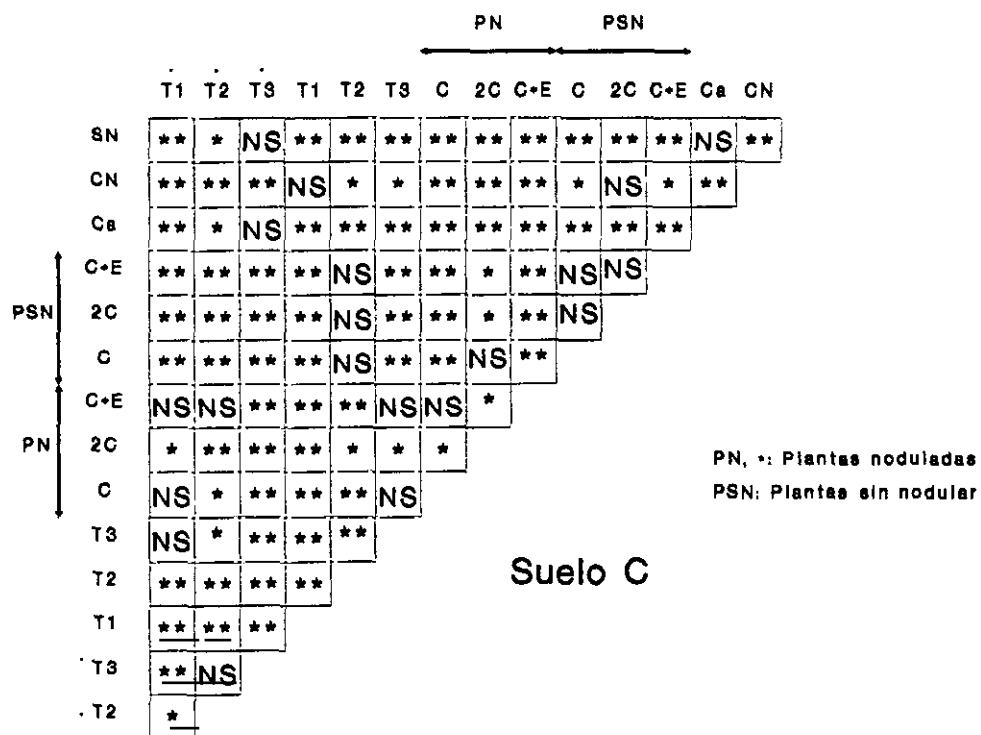
**Suelo A**

PN, \*: Plantas noduladas  
PSN: Plantas sin nodular

		PN						PSN							
		T1	T2	T3	T1	T2	T3	C	2C	C+E	C	2C	C+E	Ca	CN
PSN	SN	**	NS	NS	**	**	*	**	**	**	*	*	**	NS	**
	CN	**	**	**	*	*	**	**	NS	NS	*	*	NS	**	
	Ca	**	NS	NS	**	**	*	**	**	**	**	**	**		
	C+E	**	**	**	*	*	**	**	NS	NS	NS	*			
	2C	NS	**	**	**	NS	**	NS	NS	NS	NS				
	C	NS	**	**	**	NS	**	NS	NS	NS					
PN	C+E	*	**	**	**	NS	**	*	NS						
	2C	*	**	**	**	NS	**	**							
	C	NS	**	**	**	NS	**								
	T3	**	NS	*	**	**									
	T2	NS	**	**	**										
	T1	**	**	**											
	T3	**	NS												
	T2	**													

**Suelo B**

PN, \*: Plantas noduladas  
PSN: Plantas sin nodular





B.VIII. LSD de la interacción entre suelos y tratamientos (exudados y controles) en el estudio sobre la producción de CO<sub>2</sub> de exudados nodulares y radicales

SUELO A

N

R

	T1N	T2N	T3N	T1R	T2R	T3R	Co	2co	C+E	Co	2co	C+E
Ca	**	**	*	**	**	NS	**	**	**	**	**	**
C+E	**	**	**	**	**	**	**	*	*	**	**	
2co	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**		
Co	**	**	**	**	**	**	NS	**	**			
C+E	**	**	**	**	**	**	**	**				
2co	**	**	**	**	**	**	**					
Co	**	**	**	**	**	**						
T3R	**	**	NS	**	**							
T2R	**	*	*	NS								
T1R	**	*	*									
T3N	**	**										
T2N	NS											

R

N

SUELO B

N

R

	T1N	T2N	T3N	T1R	T2R	T3R	Co	2co	C+E	Co	2co	C+E
Ca	**	**	*	**	**	NS	**	**	**	**	**	**
C+E	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	
2co	**	**	**	**	**	**	NS	NS	**	**		
Co	**	**	**	**	**	**	**	**	**			
C+E	**	**	**	**	**	**	**	**				
2co	**	**	**	**	**	**	NS					
Co	**	**	**	**	**	**						
T3R	**	**	NS	**	*							
T2R	**	*	NS	**								
T1R	NS	**	**									
T3N	**	*										
T2N	**											

R

N

**SUELO C**

$\xleftarrow{\text{N}}$ 
 $\xrightarrow{\text{R}}$

	T1N	T2N	T3N	T1R	T2R	T3R	Co	2co	C+E	Co	2co	C+E
Ca	*	NS	NS	*	NS	NS	**	**	**	*	**	**
C+E	**	**	**	**	**	**	**	**	*	**	**	
2co	NS	*	**	NS	*	**	NS	NS	**	NS		
Co	NS	NS	*	NS	NS	*	NS	*	**			
C+E	**	**	**	**	**	**	**	**				
2co	*	**	**	*	**	**	NS					
Co	NS	NS	**	NS	*	**						
T3R	*	NS	NS	*	NS							
T2R	*	NS	NS	NS								
T1R	NS	NS	NS									
T3N	*	NS										
T2N	NS											

$\uparrow$  R

$\downarrow$  N

**SUELO D**

$\xleftarrow{\text{N}}$ 
 $\xrightarrow{\text{R}}$

	T1N	T2N	T3N	T1R	T2R	T3R	Co	2co	C+E	Co	2co	C+E
Ca	**	**	NS	**	*	NS	**	**	**	**	**	**
C+E	**	**	**	**	**	**	**	NS	**	**	*	
2co	**	**	**	**	**	**	**	NS	**	**		
Co	**	**	**	**	**	**	*	**	**			
C+E	**	**	**	**	**	**	**	**				
2co	**	**	**	**	**	**	**					
Co	**	**	**	**	**	**						
T3R	**	**	NS	**	NS							
T2R	**	*	NS	*								
T1R	NS	NS	**									
T3N	**	*										
T2N	NS											

$\uparrow$  R

$\downarrow$  N

**B.IX. LSD de la interacción entre suelos y tratamientos (exudados y controles) en el estudio sobre la producción de CO<sub>2</sub> de exudados de PN y PSN**

		PN						PSN							
		T1	T2	T3	T1	T2	T3	C	2C	C-E	C	2C	C-E	Ca	CN
PSN	SN	**	**	*	**	**	NS	**	**	**	**	**	**	NS	NS
	CN	**	**	**	**	**	*	**	**	**	**	**	**	NS	
	Ca	**	**	*	**	**	NS	**	**	**	**	**	**		
	C-E	**	**	**	**	**	**	**	**	NS	**	**			
	2C	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**				
PN	C	NS	**	**	**	**	**	**	**	**					
	C-E	**	**	**	**	**	**	**	**						
	2C	**	**	**	**	**	**	**							
	C	**	**	**	**	**	**								
	T3	**	**	NS	**	**									
	T2	**	**	*	**										
	T1	**	NS	**											
	T3	**	**												
	T2	**													

PN, \*: Plantas noduladas  
PSN: Plantas sin nodular

Suelo A

		PN						PSN							
		T1	T2	T3	T1	T2	T3	C	2C	C-E	C	2C	C-E	Ca	CN
PSN	SN	**	**	*	**	**	NS	**	**	**	**	**	**	NS	NS
	CN	**	**	**	**	**	*	**	**	**	**	**	**	NS	
	Ca	**	**	**	**	**	*	**	**	**	**	**	**		
	C-E	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**			
	2C	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**				
PN	C	NS	**	**	**	**	**	**	**	**					
	C-E	**	**	**	**	**	**	**	**						
	2C	**	**	**	**	**	**	**							
	C	**	**	**	**	**	**								
	T3	**	**	NS	**	**									
	T2	**	**	*	**										
	T1	**	NS	**											
	T3	**	**												
	T2	**													

PN, \*: Plantas noduladas  
PSN: Plantas sin nodular

Suelo B

		<div> <div>PN</div> <div>PSN</div> </div>													
		T1	T2	T3	T1	T2	T3	C	2C	C+E	C	2C	C+E	Ca	CN
PSN	SN	*	NS	NS	**	NS	**	**	**	**	**	**	**	NS	NS
	CN	**	*	NS	**	*	**	**	**	**	**	**	**	NS	
	Ca	**	*	NS	**	NS	**	**	**	**	**	**	**	**	
	C+E	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	
	2C	**	**	**	**	**	**	**	NS	NS	**				
PN	C	NS	*	**	NS	**	**	NS	**	**					
	C+E	**	**	**	**	**	NS	**	NS						
	2C	**	**	**	**	**	**	**							
	C	NS	NS	**	NS	**	**								
	T3	**	*	**	**	**									
		T2	**	NS	NS	**									
		T1	NS	*	**										
		T3	**	NS											
		T2	*												

PN, \*: Plantas noduladas  
PSN: Plantas sin nodular

Suelo C

		<div> <div>PN</div> <div>PSN</div> </div>													
		T1	T2	T3	T1	T2	T3	C	2C	C+E	C	2C	C+E	Ca	CN
PSN	SN	**	**	NS	**	**	NS	**	**	**	**	**	**	NS	NS
	CN	**	**	NS	**	**	NS	**	**	**	**	**	**	NS	
	Ca	**	**	NS	**	**	NS	**	**	**	**	**	**	**	
	C+E	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	
	2C	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	**	
PN	C	NS	**	**	**	**	**	**	**	**					
	C+E	**	**	**	**	**	**	**	**						
	2C	**	**	**	**	**	**	**							
	C	**	**	**	**	**	**	**							
	T3	**	**	NS	**	**									
		T2	NS	NS	**	**									
		T1	*	**	**										
		T3	**	**											
		T2	*												

PN, \*: Plantas noduladas  
PSN: Plantas sin nodular

Suelo D

## APENDICE C

**C.I. Resultados obtenidos en las experiencias realizadas sobre el efecto de los medios de crecimiento bacteriano en la germinación de semillas**

cepa	Nº replica	concent.	<u>Día</u>						
			<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>	<u>7</u>
O.B.33	1	10%	0	1	5	2	1	0	0
	2		0	0	4	3	1	0	0
	3		0	0	3	3	1	0	0
	1	20%	0	0	6	4	0	0	0
	2		0	1	6	3	0	0	0
	3		0	0	5	4	1	0	0
O.B.41	1	10%	0	0	6	4	0	0	0
	2		0	0	6	4	0	0	0
	3		0	0	5	4	1	0	0
	1	20%	0	5	4	1	0	0	0
	2		0	4	6	0	0	0	0
	3		0	6	3	1	0	0	0
I.B.47	1	10%	0	1	3	2	1	1	0
	2		0	0	4	1	2	0	0
	3		0	0	4	2	1	0	0
	1	20%	0	1	5	3	1	0	0
	2		0	0	4	1	2	0	0
	3		0	1	7	2	0	0	0
V.P.26	1	10%	0	0	0	1	2	1	0
	2		0	0	0	1	0	3	0
	3		0	0	0	0	2	3	0
	1	20%	0	0	0	0	1	1	0
	2		0	0	0	0	0	0	0
	3		0	0	0	0	0	0	0
P.P.27	1	10%	0	0	0	1	2	1	0
	2		0	0	0	1	1	2	0
	3		0	0	0	2	1	1	0
	1	20%	0	0	0	0	0	1	0
	2		0	0	0	0	0	0	0
	3		0	0	0	0	0	2	0
P.B.2	1	10%	0	0	1	4	1	1	0
	2		0	0	2	4	1	0	0
	3		0	0	2	4	2	0	0
	1	20%	0	1	3	6	0	0	0
	2		0	1	4	5	0	0	0
	3		0	0	5	4	1	0	0

## (Continuación C.I.)

P.B.10	1	10%	0	0	5	5	0	0	0
	2		0	0	6	4	0	0	0
	3		0	1	6	1	1	0	0
	1	20%	0	6	3	1	0	0	0
	2		0	6	4	0	0	0	0
	3		0	7	3	0	0	0	0
I.B.39	1	10%	0	0	5	4	1	0	0
	2		0	1	6	2	0	0	0
	3		0	1	5	3	0	1	0
	1	20%	0	0	4	3	1	0	0
	2		0	0	3	6	1	0	0
	3		0	1	5	1	2	0	0
O.B.22	1	10%	0	1	4	3	1	0	0
	2		0	1	5	2	1	0	0
	3		0	0	6	3	1	0	0
	1	20%	0	0	6	2	1	1	0
	2		0	0	5	4	0	1	0
	3		0	1	4	3	1	0	0
O.B.45	1	10%	0	0	6	3	1	0	0
	2		0	0	7	3	0	0	0
	3		0	0	6	2	1	0	0
	1	20%	0	6	3	0	0	1	0
	2		0	4	6	0	0	0	0
	3		0	7	2	1	0	0	0
I.B.44	1	10%	0	1	3	4	1	0	0
	2		0	0	4	4	1	0	0
	3		0	0	7	2	0	0	0
	1	20%	0	1	5	2	0	0	0
	2		0	1	6	2	0	0	0
	3		0	1	5	2	1	1	0
I.B.14	1	10%	0	1	4	5	0	0	0
	2		0	0	5	4	0	0	0
	3		0	0	3	7	0	0	0
	1	20%	0	4	4	1	0	0	0
	2		0	4	4	0	0	0	0
	3		0	5	4	1	0	0	0
V.P.12	1	10%	0	0	0	1	0	1	1
	2		0	0	1	1	0	2	0
	3		0	0	0	2	0	0	1
	1	20%	0	0	1	2	0	0	0
	2		0	0	0	1	0	1	1
	3		0	0	0	0	1	0	1

## (Continuación C.I.)

P.P.5	1	10%	0	0	0	1	2	1	0
	2		0	0	0	1	2	1	0
	3		0	0	0	2	2	1	1
	1	20%	0	0	0	1	2	1	0
	2		0	0	0	1	0	1	1
	3		0	0	0	0	1	0	1
P.B.8	1	10%	0	0	6	3	1	0	0
	2		0	0	7	2	1	0	0
	3		0	0	6	2	0	0	0
	1	20%	0	7	3	0	0	0	0
	2		0	6	2	1	0	0	0
	3		0	7	2	1	0	0	0
I.B.1	1	10%	0	1	1	3	1	1	0
	2		0	0	2	4	2	0	0
	3		0	1	3	1	1	1	0
	1	20%	0	0	6	3	0	0	0
	2		0	1	5	4	0	0	1
	3		0	0	4	5	0	0	0
O.B.34	1	10%	0	0	6	3	1	1	1
	2		0	0	5	4	1	0	0
	3		0	0	4	5	0	0	0
	1	20%	0	4	6	0	0	0	0
	2		0	5	4	1	0	0	0
	3		0	5	4	1	0	0	0
O.B.24	1	10%	0	1	4	2	2	0	0
	2		0	1	4	3	2	0	0
	3		0	0	3	5	1	0	0
	1	20%	0	0	6	3	0	1	0
	2		0	0	6	2	1	0	0
	3		0	1	6	2	1	0	0
P.B.13	1	10%	0	0	3	4	2	1	0
	2		0	1	4	3	1	0	0
	3		0	0	4	6	0	0	0
	1	20%	0	1	5	2	1	0	0
	2		0	1	6	2	0	0	1
	3		0	1	6	2	1	0	0
O.B.11	1	10%	0	0	6	3	1	0	0
	2		0	1	7	1	0	0	0
	3		0	0	7	3	0	0	0
	1	20%	0	4	4	1	0	0	0
	2		0	6	3	0	1	0	0
	3		0	5	4	1	0	0	0

## (Continuación C.I.)

O.B.25	1	10%	0	1	3	4	1	0	0
	2		0	0	5	3	1	1	0
	3		0	1	4	3	1	0	0
	1	20%	0	1	4	3	0	1	0
	2		0	0	4	4	1	0	0
	3		0	0	6	3	0	1	0
P.P.2	1	10%	0	0	0	1	2	0	0
	2		0	0	0	1	0	0	0
	3		0	0	0	0	0	1	1
	1	20%	0	0	0	0	1	1	2
	2		0	0	0	1	2	0	0
	3		0	0	0	1	1	0	0
P.P.23	1	10%	0	0	0	0	2	0	0
	2		0	0	0	1	0	2	1
	3		0	0	0	0	0	3	0
	1	20%	0	1	0	0	1	1	0
	2		0	0	1	0	0	1	1
	3		0	0	0	1	1	2	0
V.P.21	1	10%	0	0	0	1	0	0	0
	2		0	0	0	1	2	0	0
	3		0	0	0	1	1	0	2
	1	20%	0	1	0	0	0	3	0
	2		0	0	0	0	2	2	0
	3		0	0	0	1	3	0	0
I.B.48	1	10%	0	0	5	3	1	0	0
	2		0	0	6	4	0	0	0
	3		0	0	5	3	1	0	0
	1	20%	0	5	4	0	0	1	0
	2		0	4	3	1	1	0	0
	3		0	5	5	0	0	0	0
I.B.33	1	10%	0	0	6	3	1	0	0
	2		0	0	5	4	0	1	0
	3		0	0	3	6	0	0	0
	1	20%	0	6	4	0	0	0	0
	2		0	4	4	2	0	0	0
	3		0	5	5	0	0	0	0
CNTRL	1	10%	0	1	3	2	1	1	0
	2		0	1	1	3	2	1	0
	3		0	0	2	2	3	0	1
	1	20%	0	0	2	3	2	0	0
	2		0	1	3	2	1	1	0
	3		0	1	2	2	1	1	1



**C.II.1. Resultados obtenidos en las experiencias realizadas sobre el efecto de los medios de crecimiento bacteriano en el desarrollo de PN (parámetros comunes con PSN)**

Cada grupo de 6 datos corresponde a 3 réplicas, las primeras de ensayos al 10% y las segundas al 20%. Se nombran cada cepa por su código de nomenclatura junto a la primera réplica. Unidades: Superficie de la parte aérea (Sup. Aérea) y superficie radical (sup. Rad.) en cm<sup>2</sup>; Longitud de la parte aérea (Long. Aérea) y longitud radical (Long. Rad.) en cm; número de hojas (Nº.Hs.).

<u>Cepa</u>	<u>Sup. Aérea</u>	<u>Long. Aérea</u>	<u>Nº.Hs</u>	<u>Long Rad.</u>	<u>Sup. Rad</u>	<u>NT</u>
O.B.41	5.3614	4.8834	7.0	4.8701	0.9313	2.0242
	5.2133	4.8761	7.0	4.8270	0.9819	2.0453
	5.1843	4.9149	8.0	4.7141	1.0211	2.0676
	5.4192	4.7916	7.0	4.9116	0.8314	2.0382
	5.0133	4.7391	7.0	4.7891	1.0291	2.0495
	5.0260	4.8971	8.0	5.0162	1.0130	2.0323
	4.9592	4.9349	8.0	4.9139	0.9331	2.0542
	5.6314	4.7527	7.0	4.8419	0.9941	2.1310
	5.2133	4.7635	7.0	4.8361	1.0341	2.0323
O.B.45	5.2346	4.8432	7.0	4.7319	1.3619	2.1321
	5.3271	4.8391	7.0	4.9331	1.2100	2.1434
	5.1241	4.6349	7.0	4.7163	0.8613	2.0386
	9.4813	7.8362	8.0	7.8796	2.9413	3.0995
	9.2619	7.9625	10.0	7.9549	3.0122	3.0133
	9.3142	7.7594	8.0	7.8991	2.9413	3.1041
	9.2761	7.7661	8.0	7.9001	2.9443	3.0636
	9.3442	7.6321	8.0	7.8076	3.9167	3.0426
	9.1312	8.0120	10.0	7.9981	2.1239	3.0515
O.B.34	5.2134	5.0171	8.0	5.0012	1.2122	2.0139
	5.7991	4.8186	7.0	4.7631	0.8991	2.0321
	4.8012	4.8951	7.0	4.7261	0.9956	2.0661
	4.8261	4.8346	7.0	4.9613	0.9144	2.0733
	5.6712	4.8219	7.0	4.8913	0.9639	2.1042
	5.1234	4.1396	8.0	4.9931	1.1244	2.0831

## (Continuación C.II.1)

<u>Cepa</u>	<u>Sup. Aérea</u>	<u>Long. Aérea</u>	<u>Nº.Hs</u>	<u>Long Rad.</u>	<u>Sup. Rad</u>	<u>NT</u>
O.B.33	7.2133	6.5995	9.0	6.0213	1.2319	2.0329
	7.6912	7.3129	10.0	6.3271	1.4201	2.0513
	6.8134	6.3611	8.0	5.8219	0.4811	2.0661
	7.2134	6.5310	8.0	5.6377	0.8619	2.0927
	7.2249	6.8713	9.0	6.1212	0.9614	2.0031
	7.9133	6.9314	9.0	6.1099	0.9817	2.1032
O.B.22	7.0391	6.0147	9.0	4.6139	0.9613	2.0631
	6.8433	6.0319	9.0	4.2331	0.9919	2.0413
	6.6219	7.0123	8.0	4.1347	0.8641	2.0414
	7.2123	7.0131	9.0	4.8137	0.9139	2.0366
	7.4133	7.1291	9.0	4.7139	0.9412	2.0149
	6.8139	6.0832	8.0	4.6202	0.8133	2.0482
O.B.24	6.8142	6.0123	8.0	4.5918	0.8419	2.1509
	6.7956	6.0224	8.0	4.6132	0.8216	2.0136
	7.3122	7.1221	9.0	4.9613	1.0419	2.0631
	7.3149	7.1341	9.0	4.9342	1.0213	2.0137
	7.5605	7.3941	9.0	4.8959	1.0411	2.0414
	7.4211	7.2816	9.0	4.9677	1.0611	2.0139
O.B.25	6.8315	6.2122	8.0	4.6315	0.9415	1.9596
	7.3202	6.9519	9.0	4.9792	1.1776	2.0631
	7.9516	7.3391	10.0	5.1221	1.3149	2.0644
	8.0012	7.4102	10.0	5.0877	1.2085	2.0333
	7.2134	6.8312	9.0	4.9104	0.9695	2.0619
	7.4619	6.9912	9.0	4.8799	1.0133	2.0341
V.P.26	5.3134	5.0132	8.0	4.2136	0.8761	0.6334
	5.2142	4.8761	7.0	4.9233	0.8412	0.6821
	5.1311	4.8133	7.0	4.3102	0.7927	0.7104
	5.2166	4.3169	7.0	4.3121	0.8152	0.6923
	5.3104	4.3412	8.0	4.2113	0.8324	0.6362
	5.1210	4.3619	7.0	4.2142	0.8631	0.6731
V.P.12	5.1021	4.8614	7.0	4.1059	0.8411	0.7134
	5.1041	4.8161	7.0	9.2132	0.8199	0.6861
	5.1541	4.9131	8.0	4.3200	0.8380	0.6722
	5.2311	5.0213	8.0	4.3161	0.6767	0.2149
	5.3101	5.0312	8.0	4.2133	0.9145	0.6823
	5.4139	4.3630	7.0	4.1549	0.8213	0.6331

## (Continuación C.II.1)

<u>Cepa</u>	<u>Sup. Aérea</u>	<u>Long. Aérea</u>	<u>Nº.Hs</u>	<u>Long Rad.</u>	<u>Sup. Rad</u>	<u>NT</u>
V.P.21	5.3156	5.0361	8.0	4.2213	0.8612	0.6313
	5.0213	4.8619	7.0	4.1449	0.7791	0.6249
	5.2331	5.0211	8.0	4.3151	0.9313	0.6195
	5.4312	4.9695	8.0	4.4312	0.9415	0.6311
	5.0169	4.8331	7.0	4.6413	0.7613	0.6132
	5.3213	5.0133	8.0	4.5163	0.8312	0.6441
P.B.10	9.9132	7.6319	9.0	7.8131	4.0331	2.0326
	9.8826	8.7621	9.0	7.8249	4.0469	3.0822
	8.6319	7.0136	10.0	7.9152	4.0671	3.0826
	9.8543	7.7189	9.0	8.7971	4.0452	3.1259
	9.9612	7.6369	9.0	7.7839	4.0541	3.2243
	9.7634	7.9189	10.0	7.9133	4.0717	3.2125
P.B.8	4.9845	4.7331	7.0	4.7641	2.0752	2.0671
	4.9526	4.6321	7.0	4.7852	2.0534	2.0967
	5.5321	4.9618	8.0	4.9106	2.0621	2.3139
	5.6621	4.9961	8.0	4.9135	2.0726	2.0312
	4.8934	4.6391	7.0	4.7709	2.0334	2.0824
	5.4128	5.0128	8.0	4.2470	2.0312	2.1331
P.B.2	6.9969	6.7420	9.0	6.0253	1.1369	2.3126
	6.8943	6.5415	8.0	5.7312	0.8439	2.0422
	7.2313	6.6313	9.0	6.0332	1.2341	2.0843
	7.1426	6.6011	9.0	6.1014	1.1242	2.0615
	7.5941	7.2342	10.0	6.3313	1.4869	2.0962
	7.2319	6.5033	9.0	6.0414	1.0821	2.1329
I.1.37	7.3419	6.9434	9.0	6.0920	1.0222	2.0961
	7.2312	6.9512	9.0	6.1134	1.0831	2.1542
	7.6314	7.2361	10.0	6.3731	1.3841	2.1123
	7.3467	6.9006	9.0	6.0899	1.0641	2.0872
	7.9112	6.8921	9.0	6.1101	1.0743	2.0737
	6.9407	6.2331	8.0	5.8271	0.9312	2.1142
P.B.13	7.1170	7.0712	9.0	4.8223	0.9612	2.0422
	6.8485	7.1231	9.0	4.9594	1.0016	2.0536
	6.9227	7.0981	9.0	4.8316	1.0131	2.1249
	6.7635	6.7192	8.0	4.6277	0.8725	2.1305
	7.0591	7.4134	9.0	4.8349	0.9263	2.1432
	6.2316	6.9813	8.0	4.7361	0.8314	2.0621

## (Continuación C.II.1)

<u>Cepa</u>	<u>Sup. Aérea</u>	<u>Long. Aérea</u>	<u>Nº.Hs</u>	<u>Long Rad.</u>	<u>Sup. Rad</u>	<u>NT</u>
P.P.27	5.0154	5.0132	8.0	4.3313	0.8939	0.6332
	5.3731	5.0226	8.0	4.3562	0.9261	0.8424
	5.4902	4.8731	7.0	4.1034	0.8431	0.6112
	5.4715	4.8924	8.0	4.4299	0.8111	0.6333
	5.3141	4.9151	8.0	4.3314	0.9633	0.6145
	5.5570	4.9242	8.0	4.3286	0.9459	0.5933
P.P.5	5.2231	4.7136	7.0	4.1459	0.8162	0.6111
	5.5362	5.0133	8.0	4.3331	0.9625	0.6323
	5.5151	4.8131	7.0	3.9961	0.7949	0.5945
	5.5091	5.0127	8.0	4.2109	0.8621	0.8103
	5.2017	4.7954	7.0	4.1209	0.7932	0.8600
	5.5662	4.6962	7.0	4.1807	0.7875	0.2195
P.P.2	5.6931	5.0131	8.0	4.3534	0.9528	0.6191
	5.5189	4.9129	8.0	4.4027	0.9236	0.6032
	5.4426	4.6141	7.0	4.3159	0.7149	0.6501
	5.6314	5.0139	8.0	4.3267	0.8732	0.6409
	5.4231	5.0001	7.0	4.1358	0.8919	0.6401
	5.6551	5.0106	8.0	4.2953	0.8906	0.6132
P.P.23	5.3361	4.8121	7.0	4.1893	0.7003	0.5993
	5.3382	4.8742	7.0	3.9699	0.7391	0.6127
	5.6319	4.9969	8.0	4.2254	0.7220	0.6932
	5.6426	4.9581	8.0	4.3549	0.8942	0.6695
	5.3419	4.7161	7.0	4.9361	0.7131	0.6524
	5.6213	5.0123	8.0	4.3621	0.9327	0.6231
I.B.31	9.3131	7.9163	10.0	7.9631	3.9912	4.1348
	8.2072	7.8281	9.0	7.7321	2.7631	3.0616
	9.2069	8.9349	8.0	7.9886	3.0134	3.0923
	9.4125	7.0112	9.0	8.0082	2.9933	4.2302
	9.2631	7.7013	10.0	7.6987	3.9293	3.0109
	9.4432	7.9621	9.0	8.0093	3.0210	3.0452
I.B.14	5.3525	4.9309	8.0	4.9129	0.9622	2.1241
	5.2261	4.7386	7.0	4.8264	0.7614	2.1536
	5.2331	4.9527	7.0	4.7100	0.8013	2.0929
	5.3902	4.6935	7.0	4.7012	0.9440	2.0842
	5.5633	4.9749	8.0	4.9319	1.1228	2.0757
	5.4641	5.0021	8.0	4.9871	1.0136	2.0934

## (Continuación C.II.1)

<u>Cepa</u>	<u>Sup. Aérea</u>	<u>Long. Aérea</u>	<u>Nº.Hs</u>	<u>Long Rad.</u>	<u>Sup. Rad</u>	<u>NT</u>
I.B.48	5.7632	5.0134	8.0	5.0031	1.0101	2.0626
	5.3561	4.6816	7.0	4.6341	0.9966	2.0801
	5.8491	4.9321	8.0	5.0103	1.2459	2.0148
	5.6031	4.5993	7.0	4.7619	0.8322	2.1133
	5.7026	4.6389	7.0	4.8001	0.7361	2.1221
	5.8331	4.8997	8.0	4.9690	0.8225	2.0959
I.B.33	5.6361	4.6312	7.0	4.7542	0.8386	2.0334
	5.5341	4.9213	8.0	5.0043	0.9965	2.0761
	5.4316	4.7312	7.0	4.6995	0.7941	2.0831
	5.3069	4.6432	7.0	4.7212	0.8902	2.0433
	5.3453	4.6001	7.0	4.6139	0.9391	2.1648
	5.6312	4.9312	8.0	5.0028	1.3360	2.1352
I.B.47	7.2582	6.9317	9.0	6.0231	1.2261	2.2171
	7.3233	6.8790	9.0	6.1027	1.3134	2.0926
	7.0367	6.3112	8.0	5.9538	1.1987	2.0833
	7.2315	6.6391	9.0	6.0221	1.2315	2.0840
	7.6269	7.4193	10.0	6.3169	1.4363	2.0479
	7.3141	6.8136	9.0	6.0413	1.2313	2.1216
I.B.44	6.7932	6.5513	8.0	5.8361	0.8649	2.1038
	7.2431	6.9283	9.0	6.0326	0.9949	2.1242
	7.6985	7.2709	10.0	6.4010	1.4012	2.0959
	6.8419	6.4346	8.0	5.8312	0.8431	2.0241
	7.3361	6.8936	9.0	6.0131	1.0303	2.0463
	7.2593	6.9141	9.0	6.0293	1.0669	2.0931
I.B.1	7.3372	6.9322	9.0	6.0907	1.0193	2.1229
	7.3442	6.8921	9.0	6.1233	1.0435	2.1112
	7.2361	6.9553	9.0	6.0841	1.0741	2.0401
	7.3251	6.9331	9.0	6.0659	1.0669	2.0632
	7.7131	7.2423	10.0	6.3852	1.3926	2.0881
	6.8312	6.3210	8.0	5.8271	0.8322	2.0854
CNTRL	5.5349	5.3425	7.0	4.0263	1.1231	2.2359
	5.4932	5.4213	7.0	4.1021	1.2013	2.1231
	5.6001	5.2362	7.0	4.1034	1.2036	3.0168
	5.5312	5.3001	7.0	4.1231	1.2931	2.0692
	6.4313	5.9042	8.0	4.5560	1.2018	2.0941
	5.4969	5.2139	7.0	4.3221	1.1783	2.2123

**C.II.2. Resultados obtenidos en las experiencias realizadas sobre el efecto de los medios de crecimiento bacteriano en el desarrollo de PN (parámetros exclusivos de PN)**

Cada grupo de 6 datos corresponde a 3 réplicas, las primeras de ensayos al 10% y las segundas al 20%. Se nombran cada cepa por su código de nomenclatura junto a la primera réplica. Unidades: Lóbulos nodulares (Lob.Nod.), Actividad reductora del acetileno (ARA) en  $\text{nmol C}_2\text{H}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ , producción de  $\text{CO}_2$  ( $\text{CO}_2$ ) en  $\text{nmol CO}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ , y Peso nodular (PN) en g. El número de nódulos presentes en cada planta corresponde con los sumandos con que se expresa el número de lóbulos nodulares.

<u>Cepa</u>	<u>Lob. Nod.</u>	<u>ARA</u>	<u>CO<sub>2</sub></u>	<u>PN</u>
O.B.41	4	750.82	1216.21	0.0151
	4	761.39	1228.31	0.0142
	4	742.26	1231.24	0.0159
	4	741.22	1221.42	0.0123
	3	730.36	1237.38	0.0141
	4	753.21	1223.81	0.0164
O.B.45	4	752.71	1231.74	0.0132
	4	786.59	1242.14	0.0141
	3	762.23	1206.23	0.0163
	4	730.57	1236.77	0.0152
		761.36	1239.58	0.0151
	4	722.21	1217.43	0.0148
O.B.34	4	862.14	1223.12	0.0149
	4+4	943.57	1241.23	0.0136
	4	951.23	1239.12	0.0163
	4	1051.14	1251.22	0.0192
	3	953.71	1228.34	0.0159
	4	961.68	1261.12	0.0164
O.B.11	4	754.27	1239.27	0.0162
	3	745.25	1244.77	0.0161
	4	766.48	1238.21	0.0133
	4	751.93	1266.17	0.0149
	3+4	752.94	1231.25	0.0143
	4	748.37	1280.01	0.0141

## (Continuación C.II.2)

<u>Cepa</u>	<u>Lob. Nod.</u>	<u>ARA</u>	<u>CO<sub>2</sub></u>	<u>PN</u>
O.B.33	3	747.31	1225.02	0.0146
	4	751.43	1239.79	0.0152
	4	739.33	1219.14	0.0161
	4	744.21	1223.14	0.0178
	4	756.26	1222.01	0.0156
	3+4	743.02	1241.27	0.0148
O.B.22	4	744.13	1223.42	0.0121
	4	751.28	1236.49	0.0153
	3	759.71	1252.71	0.0144
	4	760.29	1223.36	0.0161
	4	745.79	1241.31	0.0143
	4	753.08	1257.02	0.0149
O.B.24	3	754.71	1232.45	0.0151
	3+4	756.66	1215.31	0.0132
	4	761.14	1229.32	0.0151
	4	762.23	1231.41	0.0151
	4	746.56	1254.19	0.0139
	3	757.01	1201.38	0.0141
O.B.25	3	712.33	1266.56	0.0145
	4	764.51	1203.01	0.0156
	4	723.03	1212.03	0.0131
	4	747.44	1223.12	0.0142
	3	758.43	1241.23	0.0141
	4+4	763.24	1205.31	0.0159
V.P.26	4	310.89	1523.39	0.0239
	4+6	320.53	1541.27	0.0241
	4+4	331.71	1563.03	0.0241
	4+3	335.57	1549.41	0.0236
	4+6	315.14	1525.93	0.0231
	4+3+4	323.31	1563.41	0.0240
V.P.12	6	321.26	1515.36	0.0245
	4+3	326.19	1564.29	0.0246
	4+4	321.17	1592.54	0.0239
	4+4	339.09	1567.42	0.0235
	4+4+3	341.35	1533.31	0.0233
	4+5	301.23	1541.24	0.0238

## (Continuación C.II.2)

<u>Cepa</u>	<u>Lob. Nod.</u>	<u>ARA</u>	<u>CO<sub>2</sub></u>	<u>PN</u>
V.P.21	6	321.76	1529.22	0.0361
	5+4	333.98	1542.44	0.0123
	4+4	342.81	1545.03	0.0231
	5+5	331.89	1563.91	0.0236
	4+5+4	339.15	1561.63	0.0239
	4+5+5	326.12	1551.31	0.0229
P.B.10	4	951.59	1201.27	0.0361
	4	969.71	1215.35	0.0187
	3	1046.23	1233.27	0.0179
	3	931.95	1245.60	0.0221
	4	848.41	1231.38	0.0234
	4	1056.31	1220.17	0.0199
P.B.8	4	754.20	1221.16	0.0212
	3	732.72	1272.63	0.0249
	4	722.31	1201.25	0.0231
	4	751.26	1233.48	0.0226
	3	731.09	1245.93	0.0241
	4	321.03	1255.91	0.0231
P.B.2	4	765.02	1242.01	0.0226
	3	742.31	1253.12	0.0231
	4	733.99	1262.15	0.0239
	4	721.33	1239.33	0.0234
	4	753.43	1229.00	0.0233
	3+3	771.32	1286.26	0.0228
I.B.39	3	776.14	1239.23	0.0163
	4	754.39	1256.62	0.0154
	4	739.41	1275.56	0.0122
	3+3	792.31	1233.71	0.0121
	4	750.02	1241.15	0.0136
	4	712.33	1238.12	0.0171
P.B.13	4	743.15	1225.22	0.0121
	4	741.14	1220.04	0.0122
	3	738.00	1231.31	0.0161
	4	736.22	1298.32	0.0131
	3+4	721.21	1131.01	0.0142
	4	754.03	1220.01	0.0126



## (Continuación C.II.2)

<u>Cepa</u>	<u>Lob. Nod.</u>	<u>ARA</u>	<u>CO<sub>2</sub></u>	<u>PN</u>
P.P.27	5	316.59	1524.27	0.0134
	5+6	325.71	1532.23	0.0137
	4+5	331.27	1551.02	0.0129
	4+5	340.52	1531.90	0.0133
	5+5+4	336.05	1544.52	0.0137
	5+5+6	352.04	1566.51	0.0127
P.P.5	6	353.03	1532.93	0.0141
	5+4	361.06	1554.48	0.0121
	5+5	323.09	1517.25	0.0139
	5+5	312.01	1531.15	0.0146
	5+6+5	371.06	1549.44	0.0150
	5+4	352.03	1516.21	0.0102
P.P.2	5	361.95	1542.92	0.0139
	6+4	342.03	1592.36	0.0139
	6+5	353.00	1496.21	0.0142
	6+6+4	358.12	1595.17	0.0133
	4+6	326.24	1422.12	0.0142
	5+6+4	331.36	1531.06	0.0121
P.P.23	6+5	341.39	1585.41	0.0129
	6	353.25	1572.31	0.0191
	5+4	321.48	1576.36	0.0102
	6+6+5	369.33	1568.31	0.0136
	4+5	341.61	1523.22	0.0134
	4+6	325.03	1549.03	0.0135
I.B.31	4	971.02	1216.63	0.0161
	3	962.70	1231.57	0.0143
	4	1059.19	1229.26	0.0139
	3	957.19	1221.38	0.0152
	4	941.23	1242.28	0.0161
	4	1052.06	1226.41	0.0143
I.B.14	3+4	744.21	1214.15	0.0139
	4	756.32	1203.56	0.0166
	4	771.75	1241.71	0.0142
	4	763.39	1259.01	0.0137
	3	761.45	1208.42	0.0171
	4	764.12	1221.32	0.0143

## (Continuación C.II.2)

<u>Cepa</u>	<u>Lob. Nod.</u>	<u>ARA</u>	<u>CO<sub>2</sub></u>	<u>PN</u>
I.B.48	4	741.00	1249.34	0.0163
	3+3	757.01	1316.46	0.0141
	4	752.34	1119.41	0.0139
	3	751.26	1223.52	0.0133
	4	759.35	1231.18	0.0162
	3	771.44	1245.51	0.0145
	4	763.31	1239.93	0.0151
	3+4	768.65	1206.92	0.0159
	4	759.93	1271.63	0.0148
I.B.33	3	767.89	1243.71	0.0163
	3	772.91	1281.97	0.0166
	4	751.02	1213.01	0.0131
	4+4	749.13	1232.82	0.0144
	3	780.23	1241.24	0.0143
	4	773.24	1259.12	0.0132
	4	721.45	1238.23	0.0163
	4	711.36	1271.11	0.0132
	3	816.58	1236.01	0.0128
I.B.47	4	751.26	1229.12	0.0131
	4	763.22	1246.01	0.0143
	4+3	741.33	1251.95	0.0154
	4	752.21	1239.24	0.0131
	4	769.44	1291.36	0.0136
	3	746.02	1236.83	0.0141
	4	773.21	1225.15	0.0136
	3	752.12	1239.49	0.0142
	4	736.04	1262.22	0.0163
I.B.44	4+4	782.31	1263.44	0.0149
	4	751.4	1241.51	0.0193
	4	725.09	1221.31	0.0166
	4	751.26	1229.12	0.0131
	4	763.22	1246.01	0.0143
	4+3	741.33	1251.95	0.0154
	4	752.21	1239.24	0.0131
	4	769.44	1291.36	0.0136
	3	746.02	1236.83	0.0141
I.B.1	3	502.31	973.25	0.0071
	2	513.48	1001.62	0.0069
	3	519.26	995.39	0.0054
	3	531.06	1000.23	0.0051
	2	495.06	997.25	0.0063
	3	512.15	999.62	0.0049
	4	773.21	1225.15	0.0136
	3	752.12	1239.49	0.0142
	4	736.04	1262.22	0.0163
CNTRL	4+4	782.31	1263.44	0.0149
	4	751.4	1241.51	0.0193
	4	725.09	1221.31	0.0166
	4	751.26	1229.12	0.0131
	4	763.22	1246.01	0.0143
	4+3	741.33	1251.95	0.0154
	4	752.21	1239.24	0.0131
	4	769.44	1291.36	0.0136
	3	746.02	1236.83	0.0141

**C.III. Resultados obtenidos en las experiencias realizadas sobre el efecto de los medios de crecimiento bacteriano en el desarrollo de PSN (parámetros comunes con PN)**

Cada grupo de 6 datos corresponde a 3 réplicas, las primeras de ensayos al 10% y las segundas al 20%. Se nombran cada cepa por su código de nomenclatura y por el número de orden (NO) junto a la primera réplica. Unidades: Superficie de la parte aérea (Sup. Aérea) y superficie radical (sup. Rad.) en cm<sup>2</sup>; Longitud de la parte aérea (Long. Aérea) y longitud radical (Long. Rad.) en cm; número de hojas (Nº.Hs.).

<u>Cepa</u>	<u>Sup. Aérea</u>	<u>Long. Aérea</u>	<u>Nº.Hs</u>	<u>Long Rad.</u>	<u>Sup. Rad</u>	<u>NT</u>
O.B.41	5.1847	4.8427	7.0	4.2081	0.9312	1.0496
	5.2351	4.9432	7.0	4.1331	1.0034	1.0481
	5.3361	4.9650	8.0	4.3002	0.9326	1.0739
	5.4312	5.0132	7.0	4.3361	0.8921	1.0542
	5.3693	5.0132	7.0	4.2945	0.9351	1.0603
	5.5012	4.9950	8.0	4.3191	1.2031	1.0713
O.B.45	5.2013	4.7211	7.0	4.2195	0.9331	1.0421
	5.2994	4.7180	7.0	4.2136	0.9342	1.1544
	5.2631	4.6315	7.0	4.1801	0.9361	1.0554
	5.4335	4.9123	7.0	4.2993	1.0032	1.0436
	5.2434	4.9331	7.0	4.3122	0.9313	1.0327
	5.2316	4.9021	8.0	4.3360	0.8922	1.0719
O.B.34	9.2031	7.7811	10.0	6.1218	3.9939	2.0714
	9.2894	8.7186	9.0	6.2316	3.9461	1.0512
	9.2776	7.6330	9.0	6.1919	2.9013	2.0639
	9.4334	7.9567	9.0	6.2221	2.9120	2.0326
	9.3421	8.8431	10.0	6.2131	3.0364	1.0671
	9.4122	7.9320	9.0	6.2031	2.8931	2.0459
O.B.11	5.2057	4.7436	7.0	4.2392	0.9379	1.0342
	5.3341	4.7499	7.0	4.2967	0.9512	1.0431
	5.2914	4.7591	7.0	4.1936	1.0331	1.0563
	5.4892	4.9467	8.0	4.2893	0.9343	1.0739
	5.4033	4.9939	7.0	4.2549	0.8936	1.0431
	5.3421	4.8716	7.0	4.2343	0.9913	1.0542

## (Continuación C.III)

Cepa	<u>Sup. Aérea</u>	<u>Long. Aérea</u>	<u>Nº.Hs</u>	<u>Long Rad.</u>	<u>Sup. Rad</u>	<u>NT</u>
O.B.33	7.0406	6.0249	9.0	4.2169	0.9614	1.0901
	6.7431	6.0134	8.0	4.4314	0.9879	1.0876
	6.9712	5.9934	8.0	4.3991	0.9233	1.0735
	7.0673	6.0231	9.0	4.2621	0.9939	1.0928
	7.0795	6.0334	9.0	4.4533	1.0221	1.0942
	6.8036	5.8562	8.0	4.3773	0.9533	1.0734
O.B.22	7.0391	6.0327	9.0	4.3634	0.9691	1.0313
	6.8391	5.7002	8.0	4.3157	1.2313	1.0426
	7.0735	6.3469	9.0	4.2367	0.7314	1.0653
	6.4364	5.8204	8.0	4.4893	0.9902	1.0331
	7.1031	6.2336	9.0	4.4254	0.8715	1.0472
	6.8371	5.8631	8.0	4.3132	0.9331	1.0827
O.B.24	6.9312	5.8145	8.0	4.3236	0.9001	1.1031
	6.8361	5.8436	8.0	4.3691	1.0210	1.0386
	7.0451	6.3121	9.0	4.2721	1.0674	1.0194
	7.0234	6.4689	9.0	4.2351	1.0391	1.0330
	6.9148	6.3571	9.0	4.3792	2.1342	1.0426
	6.7315	5.7152	8.0	4.5370	0.8001	1.0513
O.B.25	7.0439	6.9443	9.0	4.3451	0.9551	1.0621
	6.8336	6.5114	8.0	4.2913	0.9631	1.0372
	6.9103	6.7312	8.0	4.2136	0.9312	1.0967
	7.2314	6.9213	9.0	4.3531	0.8221	1.0333
	6.9133	6.8412	8.0	4.4614	1.0336	1.0211
	7.0102	6.6313	8.0	4.1320	0.9210	1.0342
V.P.26	3.5161	3.8614	4.0	1.3654	2.2471	0.3206
	4.0791	3.8971	5.0	1.4036	2.4197	0.6314
	3.3964	4.0021	4.0	1.3761	2.2633	0.4987
	4.0146	3.7897	5.0	1.4139	2.4619	0.5619
	4.6713	4.1369	6.0	1.9556	2.7910	0.4314
	4.0213	3.5102	5.0	1.3791	2.3951	0.6311
V.P.12	3.2831	3.7141	4.0	1.3192	2.2136	0.5276
	4.0126	4.0136	5.0	1.3913	2.3631	0.4123
	3.9594	3.9157	5.0	1.4172	2.3793	0.3446
	4.0311	3.8712	5.0	1.4664	2.2791	0.6193
	4.0378	3.8641	5.0	1.4233	2.3349	0.4224
	4.6456	4.1363	6.0	1.8261	3.0319	0.5351

## (Continuación C.III)

<u>Cepa</u>	<u>Sup. Aérea</u>	<u>Long. Aérea</u>	<u>Nº.Hs</u>	<u>Long Rad.</u>	<u>Sup. Rad</u>	<u>NT</u>
V.P.21	3.3192	3.7125	4.0	1.3134	2.2369	0.3938
	3.9935	3.7419	5.0	1.3991	2.2798	0.7800
	3.9622	3.8223	5.0	1.4120	2.2141	0.2132
	4.0236	3.8631	5.0	1.3428	2.3613	0.6613
	4.6533	4.2221	6.0	1.8102	2.9931	0.5541
	4.5912	4.1694	6.0	1.7834	2.9842	0.3213
P.B.10	8.3213	7.0123	8.0	7.2803	2.8369	2.0459
	9.1469	8.8761	7.0	6.1331	2.7713	1.0934
	9.1334	8.9133	7.0	6.3102	2.6713	2.0623
	8.1359	7.3102	9.0	7.2134	2.9812	1.0719
	9.2102	7.2181	10.0	6.3137	2.8613	2.0509
	9.4121	8.0312	9.0	7.1599	2.9393	2.0626
P.B.8	5.1431	4.3321	9.0	4.3169	0.9131	1.1032
	5.1632	4.3122	10.0	4.4314	0.8312	1.0191
	5.1312	4.2122	10.0	4.5100	0.9411	1.0444
	5.4312	5.1033	8.0	4.3121	0.9872	1.0334
	5.3123	4.2169	7.0	4.2916	1.0277	1.0421
	5.2126	4.3641	7.0	4.3145	0.9136	1.0613
P.B.2	7.0136	6.2314	9.0	4.3163	0.9131	1.0321
	6.9591	6.1341	9.0	4.3117	0.9364	1.0631
	6.8721	5.8122	8.0	4.2134	0.8959	1.0442
	7.0133	6.4312	9.0	4.3369	0.9312	1.0506
	7.2132	6.8176	9.0	4.2415	1.0334	1.0333
	6.8314	5.1414	8.0	4.3122	0.9361	1.0421
I.B.39	7.0589	6.3414	9.0	4.3160	1.0269	1.8310
	6.7991	6.0104	8.0	4.2150	0.9013	1.0552
	6.7935	5.9589	8.0	4.2136	0.9026	1.0799
	7.0412	6.2971	9.0	4.4216	0.9794	1.1063
	7.0539	6.3159	9.0	4.3376	0.9136	1.0942
	6.8012	5.9310	8.0	4.2501	0.9139	1.0779
P.B.13	6.9596	6.1341	9.0	4.5564	0.1577	1.0626
	6.9818	6.1432	9.0	4.4391	1.0134	1.0634
	6.7132	5.7677	8.0	3.8211	0.9891	1.0545
	7.0213	6.1231	9.0	4.3169	1.3621	1.0332
	6.9969	6.1567	9.0	4.2951	1.0121	1.0423
	6.6596	5.8841	8.0	4.3489	0.8443	1.0261

## (Continuación C.III)

Cepa	<u>Sup. Aérea</u>	<u>Long. Aérea</u>	<u>Nº.Hs</u>	<u>Long Rad.</u>	<u>Sup. Rad</u>	<u>NT</u>
P.P.27	3.4406	3.8521	4.0	1.2331	2.2133	0.4421
	3.9310	4.0556	5.0	1.3991	2.5136	0.5357
	3.9961	4.0491	5.0	1.4291	2.5319	0.3089
	3.9312	4.0399	5.0	1.3491	2.4991	0.3361
	3.8899	4.0531	5.0	1.3987	2.5012	0.6415
	4.6213	3.7962	6.0	1.7631	2.8001	0.3013
P.P.5	3.3401	3.8621	4.0	1.2133	2.3169	0.4915
	3.9169	4.0632	5.0	1.3678	2.4959	0.3621
	3.4012	3.6991	4.0	1.3441	2.2369	0.4013
	3.9413	4.0293	5.0	1.3891	2.4496	0.4321
	4.5421	4.0361	6.0	1.7912	2.8310	0.7611
	4.6131	3.8012	6.0	1.8312	3.0020	0.2013
P.P.2	3.4123	3.7961	4.0	1.3631	2.2169	0.4312
	3.3961	4.0961	4.0	1.3726	2.2312	0.2419
	4.0136	4.1234	5.0	1.3931	2.4493	0.6315
	4.0194	4.2013	5.0	1.4172	2.4152	0.5632
	4.1062	4.1622	5.0	1.5136	2.3991	0.3213
	4.6136	4.1771	6.0	1.8619	3.0013	0.6401
P.P.23	3.4821	3.8172	4.0	1.3589	2.2317	0.4039
	4.0236	4.1331	5.0	1.3910	2.3716	0.3316
	4.1309	4.2003	5.0	1.3643	2.2195	0.2012
	4.0691	3.9956	5.0	1.4001	2.3941	0.4271
	4.6136	4.1721	6.0	1.8311	2.9915	0.5105
	4.0981	4.2013	6.0	1.7994	3.0632	0.6303
I.B.31	9.1921	7.8261	10.0	7.2134	3.9342	1.0326
	8.5126	8.0230	9.0	7.3421	2.0251	1.0432
	9.1326	7.8912	9.0	8.2616	3.9631	1.0444
	9.2913	7.7991	9.0	7.2691	3.9120	1.0303
	8.4169	8.0219	10.0	7.4487	2.9950	1.0431
	9.5321	8.0134	10.0	8.3386	3.0137	1.0569
I.B.48	5.1921	4.8261	7.0	4.2134	0.9342	1.0320
	5.5126	5.0231	8.0	4.3421	1.0251	1.0450
	5.1236	4.9246	8.0	4.2616	0.9631	1.0286
	5.2931	4.7991	7.0	4.2691	0.9120	1.0481
	5.4169	5.0219	8.0	4.4487	0.9951	1.0662
	5.5321	5.0134	8.0	4.3386	1.0137	1.0593

## (Continuación C.III)

Cepa	<u>Sup. Aérea</u>	<u>Long. Aérea</u>	<u>Nº.Hs</u>	<u>Long Rad.</u>	<u>Sup. Rad</u>	<u>NT</u>
I.B.33	5.4910	5.0143	8.0	4.4102	1.0199	1.0554
	5.2613	4.7921	7.0	4.2321	0.9132	1.0423
	5.5721	5.0241	8.0	4.3434	0.9351	1.0667
	5.1332	4.8012	7.0	4.3512	0.9143	1.0444
	5.5137	5.0101	8.0	4.4614	0.9512	1.0646
	5.6002	5.0257	8.0	4.3544	1.0223	1.0621
	6.7516	5.7432	8.0	4.2993	0.9311	1.0903
	7.0861	6.3231	9.0	4.3813	0.9412	1.0600
	6.8012	5.7154	8.0	4.2671	0.9186	1.0692
	6.8011	5.7204	8.0	4.3142	0.9341	1.0901
I.B.47	6.7912	5.7163	8.0	4.2910	1.0014	1.0839
	7.0434	6.3148	9.0	4.2981	1.0106	1.0736
	7.0542	6.2691	9.0	4.3171	0.9361	1.0879
	6.8712	5.8567	8.0	4.2131	0.9801	1.0726
	7.0331	6.2233	9.0	4.3151	0.9491	1.0941
	6.9102	5.8007	8.0	4.3160	0.8996	1.0639
	7.0454	6.3505	9.0	4.4121	0.9510	1.0852
	6.8621	5.7906	8.0	4.2334	0.8715	1.0820
	7.0136	6.0361	9.0	4.3836	0.9145	1.1043
	7.0441	6.3030	9.0	4.2164	1.0162	1.1051
I.B.1	6.8013	5.7842	8.0	4.2139	0.9170	1.0816
	6.7923	5.7651	8.0	4.3143	0.9413	1.0828
	7.0291	6.1761	9.0	4.3691	0.9316	1.0831
	6.9974	6.4551	9.0	4.3123	0.9613	1.0951
	5.3330	5.2601	6.0	3.1262	1.1221	1.0434
	5.3431	5.2342	6.0	3.2100	1.2011	1.0381
	5.5013	5.3121	7.0	3.1391	1.2036	1.0559
	5.4916	5.4116	7.0	3.2310	1.1959	1.0439
	5.5014	5.3013	7.0	3.3361	1.2013	1.0526
	5.3210	5.2102	6.0	3.3210	1.1894	1.0542
CNTRL						